

## Tesis Doctoral

# Perfil de activación de macrófagos de ratones nod: efecto de la preñez y modulación por el péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Larocca, Luciana

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Larocca, Luciana. (2010). Perfil de activación de macrófagos de ratones nod: efecto de la preñez y modulación por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Larocca, Luciana. "Perfil de activación de macrófagos de ratones nod: efecto de la preñez y modulación por el péptido intestinal vasoactivo (VIP)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

PERFIL DE ACTIVACION DE MACROFAGOS DE RATONES  
NOD: EFECTO DE LA PREÑEZ Y MODULACION POR EL  
PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Química Biológica

Doctorando:	Luciana Larocca
Directora de tesis:	Dra. Claudia Pérez Leirós
Consejera de estudios:	Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica.

Buenos Aires, 2010

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a Cali (Claudia Pérez Leriós) por abrirme las puertas de su laboratorio, por enseñarme que se puede hacer lo que uno quiere y principalmente por su generosidad y gran calidez humana.

A todos mis compañeros, AMIGOS, del labo QB-10 que hicieron de mi trabajo un lugar divertido y acá vale la pena destacar algunas cualidades de cada uno:

A Mario por compartir todo este tiempo conmigo, por enseñarme, por las discusiones y revuelos que armábamos y por estar SIEMPRE,

A Vale por enseñarme y por la paciencia que tiene y particularmente... por tenerme paciencia!

A Rochy por sus consejos de trabajo y vida y porque siempre tiene la locomotora encendida para dar fuerzas.

A Lau y Julio (mis becarios del alma) por su alegría y por ser tan buenas personas,

A Vane, la última semillita, por su buena onda y simpatía.

A la Dra Alcira Nesse por estar en momentos en que necesitábamos una mano, y a todo su laboratorio, a Mari, Dai, Shirley, Dani, Maru y Nico por hacer mis almuerzos y tardes divertidas.

A Diego por su ayuda desinteresada.

A laboratorio de la Dra. Ana Franchi y todos sus chicos, Lauchi, Juli, Clau, Maki, Mica, Rami por estar siempre ayudando desde la distancia.

A toda la gente de los desayunos por todas las ideas aportadas

A toda la gente de Análisis Biológicos: Irene, Ana, Graciela, Mercedes, Lucía por todos los días compartidos.

A la gente del Bioterio por hacer que el trabajo parezca un paseo divertido.

A toda la gente de mantenimiento y limpieza del departamento de Química Biológica.

Quiero agradecer enormemente a toda mi familia, a mi papá, mamá, a mi hermano, tío y a toda mi familia política por el esfuerzo y por creer que esto era posible.

A todas mi amigas por estar siempre de alguna forma dispuestas a escuchar

Y en especial a mis amores Esteban y Agustín quienes me enseñan todos los días que vale la pena seguir luchando, sin la fuerza de ellos nada de esto hubiese sido posible.

A todas las personas que de alguna forma aportaron a esta tesis

*A Esteban, Mai y Agustín*

INDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	6
1. GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	7
2. MACRÓFAGOS: FUNCIONES Y MEDIADORES	13
3. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	22
3.1 VIP (PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO)	23
3.2 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DURANTE LA GESTACIÓN	27
4. MODELO NOD	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Animales utilizados	33
2. Caracterización del modelo NOD	34
2.1 Perfil Hormonal: progesterona, estradiol y corticosterona en hembras vírgenes y preñadas	34
2.2 Niveles de Glucosa en sangre	35
2.3 Tasa de flujo salival	36
2.4 Perfil de Citoquinas en suero	36
3. Cultivos primarios y co-cultivos	36
3.1 Macrófagos peritoneales	37
3.2 Timocitos e inducción de la apoptosis	38
3.3 Cultivo primario de Acinos	48
3.4 Co-cultivos	39
3.4.1 Macrófagos y timocitos	39
3.4.2 Macrófagos y Acinos	39
4. Producción de mediadores.	39
4.1 Determinación de nitritos	39
4.2 Determinación de citoquinas	40
4.2.1 ELISA	40
4.2.2 Ensayo biológico para TNF- $\alpha$	40
4.3 Producción de PGE2	41
4.4 Expresión de NOS 2 y COX-2	41
5. Fagocitosis	42
5.1 Microscopia Óptica	42
5.2 Microscopia Electrónica	42
6. Microscopia Confocal	42
6.1 Translocación de p65 de NF-kB	42
6.2 Ensayo de TUNEL	43
7 Ensayos de RT-PCR	44
7.1 Extracción de RNA y pasaje a cDNA	44
7.2 Transcripción reversa y amplificación de fragmentos	44
8. Ensayos de Western Blot	45
8.1 Obtención de las muestras: preparación de extractos citosólicos y nucleares	45
8.2 Electroforesis en geles SDS-PAGE, Transferencia, Incubación con anticuerpos y Revelado	46
9. Marcaciones por citometría de flujo	47

10. Determinación de la concentración de proteínas	48
11. Análisis estadísticos	48
RESULTADOS	49
Parte 1: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo inflamatorio	50
A) Perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD	50
A.1) NITRITOS	50
- Condiciones basales y respuesta al LPS	50
- Efecto de VIP	51
A.2) CITOQUINAS	53
- Condiciones basales y respuesta al LPS.	54
- Efecto de VIP.	54
A.3) Modulación entre NO <sub>2</sub> e IL-10.	57
Conclusiones parciales parte 1 A: Perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD	62
B) Señales intracelulares involucradas en los efectos observados	63
B.1) Participación de NF-κB. Activación y translocación de p65	63
- Condiciones basales y respuesta al LPS:	63
- Efecto de VIP	64
B.2) Vías de transducción involucradas en el efecto de VIP	66
- Inhibición de la vía de p65	66
- <i>Inhibición de la vía de AMPc/PKA</i>	68
- Inhibición de la vía de PI3K	69
Conclusiones parciales parte 1 B: Señales intracelulares involucradas en los efectos observados	70
Parte 2: Efecto de la preñez sobre el perfil de activación de los macrófagos.	71
A) Perfil de activación en condiciones basales y frente a LPS	71
B) Señales intracelulares durante la preñez	73
C- Efecto de la progesterona en macrófagos peritoneales de hembras NOD no preñadas	74
Conclusiones Parte 2: Efecto de la preñez sobre el perfil de activación de los macrófagos	75
Parte 3: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo fagocítico	76
A) Perfil de activación	76
A.1) Inducción de la apoptosis en timocitos	76
A.2) Fagocitosis	77
A.3) Producción de mediadores por macrófagos	80
B) Señales intracelulares involucradas y cinética de fagocitosis	83
- Condiciones basales y respuesta a timocitos apoptóticos	83
Conclusiones Parte 3: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo fagocítico	89
Parte 4: Respuesta de los macrófagos peritoneales a timocitos apoptóticos durante la Preñez	90
A) perfil de activación	90
A.1) Fagocitosis	90
A.2) Mediadores	91
B) Señales intracelulares y cinética de fagocitosis	92
Conclusiones Parte 4: Respuesta de los macrófagos peritoneales a timocitos apoptóticos durante la Preñez.	96
Parte 5: Acinos apoptóticos como estímulo para la fagocitosis	97
A) Fagocitosis	97
B) Mediadores	98
C) Efecto de la gestación en el dialogo macrófagos-acinos	99
Conclusiones Parte 5: Acinos apoptóticos como estímulo para la fagocitosis	100

DISCUSIÓN	101
BIBLIOGRAFÍA	120
ABREVIATURAS	137



### RESUMEN

Una de las consecuencias de una mala resolución de la inflamación aguda es el establecimiento de un proceso inflamatorio crónico con diversos eventos asociados como, por ejemplo, alteración de la homeostasis, falla funcional y la posibilidad de inducción de pérdida de la tolerancia inmunológica.

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una severa disfunción secretoria salival y lagrimal conocida como sintomatología *sicca*. Como la mayoría de las enfermedades reumáticas afecta en mayor medida a mujeres

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) ofrecen un modelo interesante para estudiar procesos de mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular que conducen a pérdida de tolerancia y autoinmunidad. En este modelo a partir de las 12 semanas, en el estado prediabético, desarrollan una sialadenitis espontánea a predominio Th1 con pérdida de la función secretoria, semejante en algunos aspectos a la enfermedad en humanos. Por otro lado, en el modelo NOD prediabético observamos una disminución de la tasa de natalidad a partir de la tercera preñez y en esos casos hemos observado procesos de reabsorción embrionaria a los 10 días de gestación

Los macrófagos son células del sistema inmune que están altamente especializadas y cumplen un papel destacado en la inmunidad anti-infecciosa ya que tienen alta capacidad fagocítica, microbiostática y microbicida.

El VIP por su naturaleza como factor anti-inflamatorio que se lo ha propuesto como agente terapéutico para patologías autoinmunes, como la artritis reumatoide (AR) y la enfermedad de Crohn.

En la primera y segunda parte de este trabajo quisimos ver como respondían los macrófagos NOD frente a LPS y presentamos evidencias que producen mayores niveles de mediadores pro-inflamatorios y menor cantidad de IL-10; VIP, por su parte, modula la respuesta inflamatoria actuando a través de la producción de IL-10 y metabolitos de COX, como por ejemplo la PGE2, que limitan la producción de nitritos. Asimismo los macrófagos NOD presentan una translocación

basal de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y VIP inhibe la translocación. La preñez normaliza todos los factores antes mencionados

En una tercera y cuarta parte quisimos determinar cómo respondían los macrófagos NOD frente a timocitos apoptóticos y como se modifica durante la preñez y observamos que producen mayores niveles de mediadores pro-inflamatorios y menor cantidad de IL-10, también observamos translocación basal de la subunidad p65; de NF- $\kappa$ B y el VIP podría modular la respuesta inflamatoria como pasaba frente a LPS. Mientras que durante la preñez no se observa translocación a nivel basal de p65 y los macrófagos producen menores niveles de nitritos en presencia del estímulo apoptótico y se induce la producción de IL-10 por este estímulo, no requiriendo del VIP.

Finalmente, en la quinta parte estudiamos cómo se comportan los macrófagos NOD frente a células acinares y pudimos ver que en presencia de ese estímulo tanto los nitritos como IL-10 se comportan a lo observado frente a LPS.

**Palabras claves:** NOD – macrófagos – Autoinmunidad – VIP - preñez

## ABSTRACT

The establishment of a chronic inflammatory process is one of the various consequences of an impaired resolution of the acute inflammatory response. It involves several associated events such as homeostatic imbalance, functional failure and immunotolerance loss.

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disease characterized by a severe secretory dysfunction known as *sicca* syndrome and, as most autoimmune diseases, it affects women with higher incidence.

Non obese diabetic (NOD) mice offer an interesting model to study tissue homeostasis maintenance or disruption that might lead to tolerance loss and autoimmunity. At 12 weeks of age in the prediabetic stage mice develop a Th1 predominant spontaneous sialoadenitis resembling SS. On the other hand, a reduced birthrate was observed in prediabetic NOD females that were 16 weeks of age at the time of mating with an increased resorption rate as determined at 10 days of gestation.

Macrophages are immune cells highly specialized and with a major role in anti-infectious immunity due to their high phagocytic and anti-microbial activity.

Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) has strong anti-inflammatory effects and it has been proposed as a therapeutic agent for autoimmune pathologies as Rheumatic Arthritis and Crohn Disease.

In the first and second parts of this work we analyzed the macrophage response upon LPS stimulus and we present evidence of their higher levels of pro-inflammatory mediators and lower of IL-10; and that VIP modulates the inflammatory response through the production of IL-10 and COX metabolites as PGE2 thus limiting nitrites production. Likewise, NOD macrophages present a basal translocation of p65 subunit of NF- $\kappa$ B and VIP inhibits this effect. Pregnancy, in turn, normalizes these parameters.

The third part of this Thesis shows the response of macrophages upon a phagocytic stimulus as that of apoptotic thymocytes and how this may change during pregnancy. We observed that they

produce higher levels of proinflammatory mediators and lower levels of IL-10; we have also seen p65 basal translocation to the nucleus in these cells. VIP could also modulate the inflammatory response as observed in LPS stimulated macrophages. Macrophages isolated from pregnant NOD mice do not show basal translocation of p65, they do not produce nitrites when faced with a phagocytic stimulus and they secrete IL-10 even in the absence of VIP.

Finally, we determined the response of macrophages co-cultured with acinar cells and we found that acini induce a similar inflammatory response to that observed with LPS.

**Key words:** NOD – macrophages – autoimmunity- VIP - pregnancy

## INTRODUCCIÓN

### 1- GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es un proceso complejo que se caracteriza por modificaciones locales y coordinadas de los vasos sanguíneos y el tejido conectivo, se relaciona con el proceso de reparación, que consiste en la regeneración de las células parenquimatosas dañadas, y con la cicatrización, que requiere la proliferación de tejido fibroblástico. La inflamación es un proceso propio del tejido conjuntivo vascularizado y en ella participan el plasma y las células circulantes y residentes del tejido conjuntivo. Se caracteriza clínicamente por calor, rubor, tumor, dolor y en muchos casos pérdida de función. Los elementos principales que participan en este proceso son los mediadores de la inflamación, vasos sanguíneos y varios tipos de células: granulocitos, monocito-macrófagos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos (ver figura A).

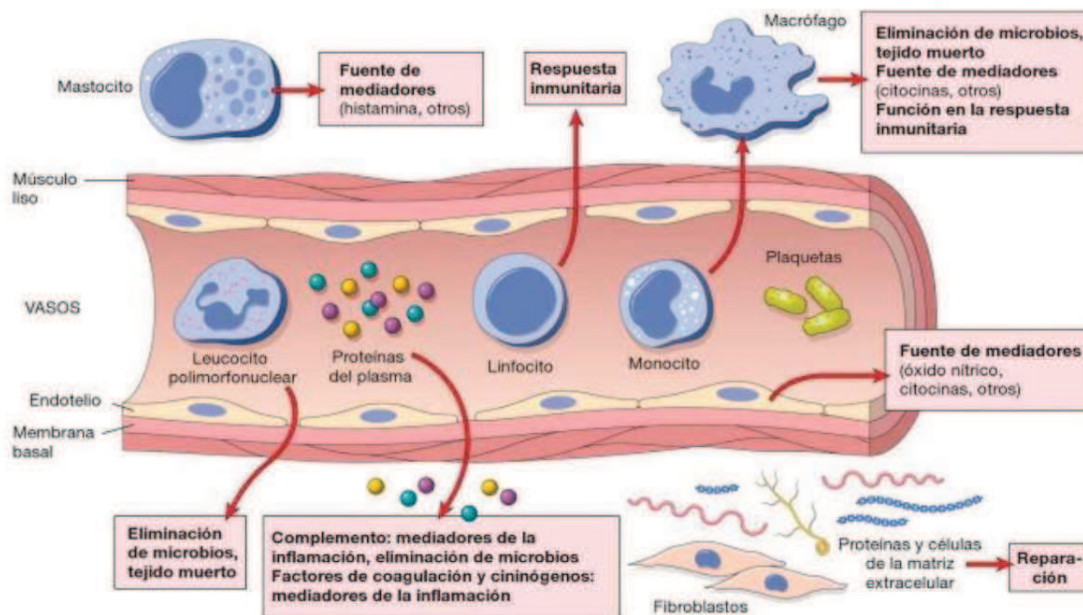


Figura A: Elementos que participan del proceso inflamatorio (Kumar V & Stanley Robbins L, 2007)

En forma resumida, el proceso inflamatorio se inicia cuando los leucocitos que viajan por el torrente sanguíneo se adhieren al endotelio, atraídos por moléculas que produce el propio endotelio y otras células inflamatorias; luego los leucocitos migran entre las células endoteliales y llegan al foco inflamatorio, donde se ha producido el daño tisular, origen de todo el proceso. Entre las principales características de la inflamación se encuentra el aumento del flujo sanguíneo, el aumento de la permeabilidad capilar y venular y la movilización de células inflamatorias hacia el foco en que se produjo el daño.

Los mediadores inflamatorios pueden ser producidos localmente por células inflamatorias o bien pueden estar circulando como precursores inactivos y activarse inducidos por el foco inflamatorio. Los mediadores derivados de células pueden estar en gránulos intracelulares y ser secretados durante la activación celular (histamina por ejemplo) o bien pueden ser sintetizados *de novo* en respuesta a determinados estímulos (prostaglandinas, citoquinas, entre otros). Mientras que los mediadores inactivos derivados habitualmente de proteínas del plasma (proteínas del complemento, quininas) sufren modificaciones proteolíticas para adquirir sus actividades biológicas.

Por tanto los mediadores de la inflamación pueden ser de origen plasmático o celular. Entre los mediadores de origen plasmático están los que provienen del sistema de complemento; del sistema de coagulación, que termina con la producción de trombina; del sistema fibrinolítico, que produce fibrinopéptidos y del sistema de quininas que genera bradiquinina. Cuando se produce daño endotelial se activa inicialmente el sistema de complemento, que induce una activación simultánea de la cascada de la coagulación, del sistema fibrinolítico y de la vía de la bradiquinina. La activación de estos sistemas conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación, entre otros efectos.

El sistema del complemento produce aumento de la permeabilidad vascular, lo que permite la extravasación de plasma, inmunoglobulinas y células que participarán en la inflamación, como linfocitos, monocitos y polimorfonucleares; esto se logra principalmente gracias a la acción de los componentes C3a, C4a y C5a, mientras que el fragmento C3b participa en la opsonización de patógenos y remoción de complejos inmunes. El sistema del complemento también tiene un rol en la liberación de citoquinas y en el reclutamiento celular, lo que determina un ambiente pro-

inflamatorio. Este sistema es muy relevante en Reumatología, ya que muchas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoidea (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES) y el Síndrome de Sjögren son mediadas por complejos antígeno-anticuerpo que activan al sistema del complemento (Wu X et al 2007).

Entre los mediadores de origen celular destacan histamina, serotonina y heparina, que actúan en la fase inicial del proceso inflamatorio, además de prostaglandina E2 (PGE2), leucotrieno B4 (LTB4) y factor activador plaquetario (PAF). Algunos neuropéptidos liberados *in situ* ante la injuria tisular (sustancia P como ejemplo), de forma análoga a las aminas vasoactivas (histamina), pueden desencadenar respuestas inflamatorias regulando el tono y la permeabilidad vascular.

Las citoquinas, principalmente sintetizadas por células inmunes inducidas en la respuesta inflamatoria, juegan un rol fundamental en la propagación y cronicidad de la inflamación, en especial la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Otras citoquinas importantes en este proceso son la interleuquina 8 (IL-8) y la interleuquina 17 (IL-17) (Brent S et. al 2006). Vale destacar que, por ejemplo el TNF puede encontrarse preformado y almacenado en gránulos de mastocitos y, de este modo, liberarse en etapas muy tempranas del proceso inflamatorio sin requerimiento de síntesis *de novo* (Walsh LJ et. al 1991b)

Asimismo es importante el rol de las quimioquinas, pequeñas proteínas que poseen propiedades quimiotractantes para determinados leucocitos, siendo una de sus principales funciones atraer a los mismos hacia el foco inflamatorio y, una vez que están en la zona inflamada, también tiene la capacidad de activarlos.

Si bien se puede hablar de una respuesta estereotipada y única en cuanto a los fines últimos de reparación tisular y mantenimiento de la función específica del tejido u órgano inflamado, a grandes rasgos existen dos tipos de respuesta inflamatoria: una respuesta inflamatoria ante la agresión por bacterias y otros patógenos, y una respuesta al daño celular no infeccioso (por ejemplo, traumático o químico) iniciada por productos liberados de forma endógena por las células lesionadas o muertas por necrosis, también conocida como inflamación estéril. En ambos casos, una vez neutralizada la agresión, la inflamación promueve los procesos de reparación (cicatrización) y retorno a la homeostasis tisular.

La mayoría de los mediadores inducen sus efectos al unirse a receptores presentes en células blanco, sin embargo existen mediadores que tienen actividades directas, tóxicas o de ambos tipos. En la respuesta inflamatoria frente a una infección, se produce el reconocimiento del agente infeccioso por lo cual determinadas células inmunes reconocen estructuras altamente conservadas denominadas patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) presentes en la mayoría de las bacterias y virus. Dentro de los tipos celulares que expresan receptores que reconocen a los patógenos y que actúan durante una etapa temprana de la respuesta inflamatoria se encuentran los macrófagos que residen en los tejidos y las células dendríticas (Mellman, I et al 2001). Los mastocitos también participan durante las fases tempranas de la inflamación a través de la liberación de citoquinas y mediadores preformados (Kumar, V et al 2007).

Los macrófagos y células dendríticas, gracias a su capacidad fagocítica, reconocen a los patógenos vía los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) que expresan sobre su superficie (Medzhitov, R. 2007). Este reconocimiento activa a fagocitos y mastocitos produciéndose la liberación de citoquinas y mediadores preformados como histamina, prostaglandinas y leucotrienos (Malaviya, et al 1996).

Luego de esta primera etapa de reconocimiento del agente extraño se produce el reclutamiento de las células inflamatorias donde principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 y los mediadores lipídicos producen cambios morfológicos y moleculares que conducen colectivamente a incrementar la migración de leucocitos y a aumentar el flujo sanguíneo al sitio de infección. Los primeros en llegar son los neutrófilos seguidos por los monocitos (Nathan, C. 2006); los neutrófilos liberan sus gránulos que contienen, entre otras sustancias, proteasas capaces de disgregar al patógeno, también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), que causan la disrupción de lípidos y dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Nathan, C & Shiloh, M.U. 2000) por lo tanto no sólo pueden producir daños al patógeno sino también a las propias células y tejidos vecinos (Nathan, C. 2006.). Una vez que los neutrófilos cumplen su función, inducen su propia muerte celular programada y liberan señales que activan a los macrófagos para fagocitarlos y terminar así de destruir a los patógenos.

Finalmente, si el proceso es exitoso, se produce la resolución de la inflamación. La identificación de estas señales incluye un amplio espectro de investigación y existen mediadores derivados de lípidos que tienen un fuerte rol anti-inflamatorio, en particular, lipoxinas, protectinas y resolvinas



que envían señales anti-inflamatorias para resolver el daño tisular (Serhan, C.N. 2007). De estos componentes el más caracterizado es el de las lipoxinas derivadas del ácido araquidónico (AA) generado por lipoxigenasas (Serhan, C.N & Savill, J. 2005). Las lipoxinas detienen el influjo de neutrófilos y promueven la fagocitosis de los macrófagos, sin embargo cómo se produce el proceso es poco claro y existen evidencias que indican que las propias células de la respuesta inmune (neutrófilos, macrófagos) y células epiteliales inducen al inhibidor de proteasas secretorias de leucocitos SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) (Ashcroft, G.S et al 2000) para detener el influjo de fagocitos y retornar a la homeostasis.

Como se mencionó más arriba, se puede generar una respuesta inflamatoria en ausencia de algún tipo de infección, conocida como inflamación estéril, esto sucede en casos de trauma, isquemia y en isquemia y re-perfusión donde también se producen todos los procesos mencionados arriba (Chen, C. J et al 2007). El origen de este tipo de inflamación sucede cuando las células al morir por necrosis liberan ciertas moléculas endógenas implicadas en la injuria que tiene lugar durante una inflamación estéril; algunos de esos ligandos endógenos incluyen proteínas de shock térmico,  $\beta$  defensinas y cristales de ácido úrico entre otras biomoléculas (Bianchi, M.E et al 2007; Nathan C 2001). Estos ligandos endógenos pueden estimular a la familia de receptores de tipo *toll* (TLRs), más específicamente los restos de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN) liberados desde las células necróticas pueden servir como ligando para determinados TLRs (Marshak-Rothstein, A. et al 2006) y se ha visto que determinadas proteínas endógenas son las que entregan estos ligandos a los TLRs a través de lisosomas y endosomas. En particular se vio que la proteína nuclear que une ADN llamada HMGB1 por su sigla en inglés, *high-mobility group box 1*, es liberada desde las células necróticas así como de macrófagos activados y facilita la unión del ADN de las células necróticas a los TLRs (TLR9, 2 y 4). Incluso, se ha propuesto recientemente que HMGB1 por sí misma es un ligando del TLR-2 y TLR-4 (Park JS et al. 2006). HMGB1 es considerada una proteína de alta letalidad en este proceso ya que se vio que su neutralización mediante anticuerpos reducía la letalidad en modelos murinos de shock endotóxico (Wang, H., et al. 1999).

## INTRODUCCIÓN

Una de las consecuencias de una mala resolución de la inflamación aguda es el establecimiento de un proceso inflamatorio crónico con diversos eventos asociados como, por ejemplo, alteración de la homeostasis, falla funcional del órgano y la posibilidad de inducción de pérdida de la tolerancia inmunológica.

En la siguiente tabla (tabla A) se mencionan, a modo de resumen, algunos de los mediadores de la inflamación cuya acción ha sido dilucidada en procesos vasculares, quimiotácticos e inmunes.

Mediadores de la inflamación (fase aguda)				
Mediador	Origen	Acciones / Efectos		
		Extravasación vascular	Quimiotaxis	Otros
Histamina y serotonina	Mastocitos, plaquetas	+	-	
Bradiquinina	Sustrato plasmático	-	-	Dolor
C3a	Proteína plasmática vía hígado	+	-	Fragmento opsónico (C3b)
C5a	Macrófagos	-	+	Adhesión, activación leucocitaria
Prostaglandinas	Fosfolípidos de membrana, mastocitos	Potencian otros mediadores	-	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrieno B4	Leucocitos	-	+	Adhesión, activación leucocitaria
Leucotrienos C4, D4, E4	Leucocitos, mastocitos	+	-	Vasoconstricción
Metabolitos de oxígeno	Leucocitos	-	-	Daño endotelial y tisular
PAF	Leucocitos, mastocitos	+	+	Cebado leucocitario
IL-1, TNF	Macrófagos, otros	-	+	Reacciones de fase aguda
Quimioquinas	Leucocitos, otros	-	+	Activación leucocitaria
Oxido nítrico	Macrófagos, endotelio	+	+	Vasodilatación, citotoxicidad

Papel de los mediadores en diferentes respuestas de la inflamación	
Vasodilatación	Prostaglandinas, NO, histamina
Aumento de la permeabilidad vascular	Aminas vasoactivas, C3a y C5a, bradiquinina, leucotrienos C4, D4, E4, PAF, sustancia P
Quimiotaxis, reclutamiento y activación leucocitaria	C5a, leucotrieno B4, quinoquinas, IL-1, TNF, productos bacterianos
Fiebre	IL-1, TNF, prostaglandinas
Dolor	Prostaglandinas, bradiquinina
Daño tisular	Enzimas lisosomales de neutrófilos y macrófagos. Metabolitos de oxígeno, NO

**Tabla A. Mediadores y sus efectos en la inflamación.**

## 2- MACRÓFAGOS: FUNCIONES Y MEDIADORES

Los macrófagos son células tisulares derivadas de los monocitos de la sangre después de su migración a través del torrente circulatorio. Se hallan normalmente diseminados de modo difuso en la mayoría de los tejidos conjuntivos y también se encuentran en órganos como el hígado (donde se llaman células de Kupfer), bazo y ganglios linfáticos (denominados histiocitos sinusoidales), sistema nervioso central (células microgliales) y pulmones (macrófagos alveolares). En conjunto estas células comprenden el sistema monocítico mononuclear. Los macrófagos son células del sistema inmune que están altamente especializadas y cumplen un papel destacado en la inmunidad anti-infecciosa ya que tienen alta capacidad fagocítica, microbiostática y microbicida. En todos los tejidos los macrófagos actúan como filtros para microorganismos, células senescentes, restos tisulares, cuerpos apoptóticos, entre otros, y también actúan como centinelas para alertar al sistema inmune innato y adaptativo frente a estímulos lesivos.

La vida media de los monocitos circulantes es de aproximadamente un día, bajo la influencia de moléculas de adhesión y agentes quimiotácticos comienzan a migrar al sitio de lesión entre las 24 a 48 hs del comienzo de la inflamación aguda. Cuando los monocitos alcanzan el tejido extravascular se transforman en macrófagos de mayor tamaño, con mayor vida media y con una mayor capacidad de fagocitosis que los monocitos de la sangre, mayor contenido de enzimas lisosomales, es decir con un metabolismo más activo (Strauss-Ayali D et al 2007).

## INTRODUCCIÓN

Las señales que pueden activar a los macrófagos incluyen endotoxinas bacterianas y otros productos microbianos, citoquinas secretadas por linfocitos T sensibilizados, particularmente interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y varios mediadores producidos durante la inflamación aguda, entre otros. Por tanto cuando el macrófago es activado por estas señales libera IL-1, que activa al endotelio y a linfocitos y también produce TNF- $\alpha$  que actúa sobre el endotelio, donde induce reclutamiento celular, favorece la expresión de moléculas de adhesión y estimula la extravasación de plasma.

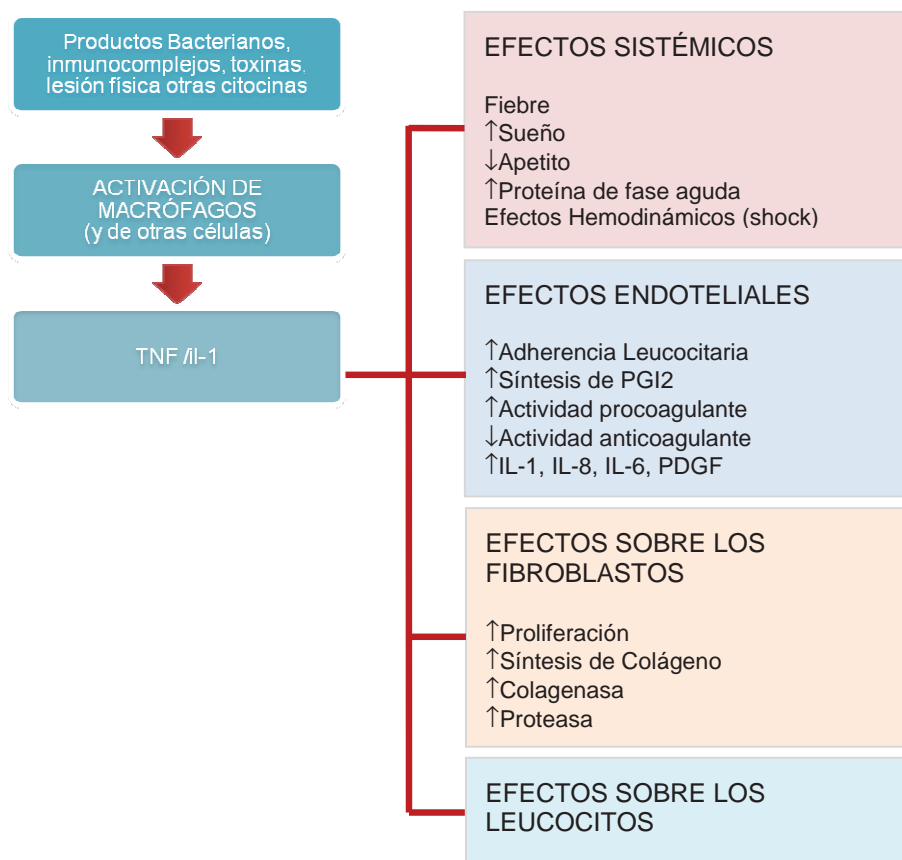


Figura B: Efectos de los mediadores celulares IL-1 y TNF- $\alpha$

Luego de que cede el estímulo inflamatorio, los macrófagos mueren o vuelven hacia los órganos linfáticos. Sin embargo, en los sitios de inflamación crónica persiste la acumulación de macrófagos que pueden proliferar.

## INTRODUCCIÓN

Los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos y en respuesta al reconocimiento de PAMP o citoquinas, producidas de forma autócrina o por otros tipos celulares, secretan un amplio espectro de citoquinas. Es decir, la activación de los macrófagos puede darse en respuesta a dos señales: IFN- $\gamma$  producido por células de la respuesta innata como las células *natural killer* (NK) o en forma más tardía por células Th1; y la interacción entre TLR y PAMPs. La combinación de ambas señales resulta en la activación de los macrófagos que secretan una variedad de productos biológicamente activos (Zhang X et al 2008) que si no son regulados pueden producir daño tisular; algunos de los productos son: proteasas ácidas y neutras, citoquinas y quimioquinas, ROS y NO (óxido nítrico) y metabolitos del ácido araquidónico.

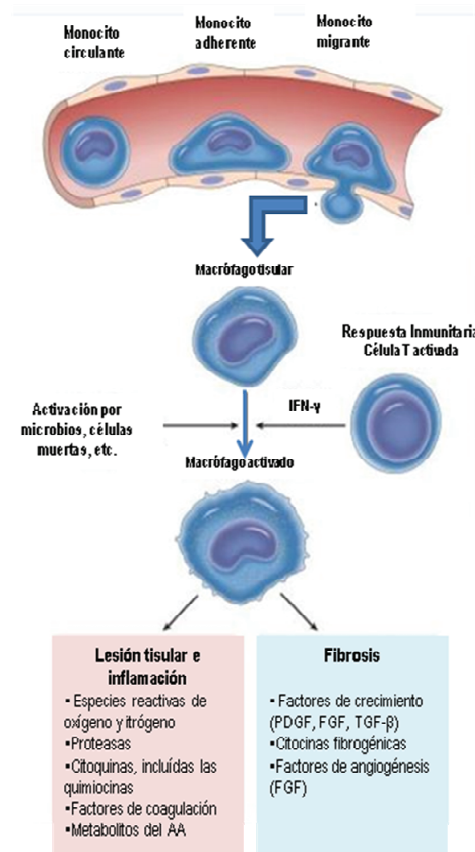


Figura C: Activación de los macrófagos: puede causar daño tisular y fibrosis (tomado de: ídem fig. A, pp: 7).

**a- proteasas ácidas y neutras;** el interferón estimula a los lisosomas de los macrófagos para que secreten hidrolasas ácidas (colesterol esterasa) y proteasas neutras (elastasas y

## INTRODUCCIÓN

colagenasas) que ayudan a proteger contra la entrada de virus, bacterias y parásitos. Estas proteasas destruyen las proteínas estructurales tales como colágeno, elastina y fibronectina y fragmentan el fibrinógeno, factor de Hageman, complemento y otras proteínas plasmáticas. Así, la destrucción local y la amplificación de la inflamación pueden desencadenar la coagulación intravascular.

**b- citoquinas y quimioquinas;** dentro de las citoquinas que producen podemos nombrar IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 que median la inducción de la respuesta inflamatoria aguda, local y sistémica; interleuquina 12 (IL-12) e interleuquina 18 (IL-18) que orientan el curso futuro de la respuesta inmune adaptativa; IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que modulan la

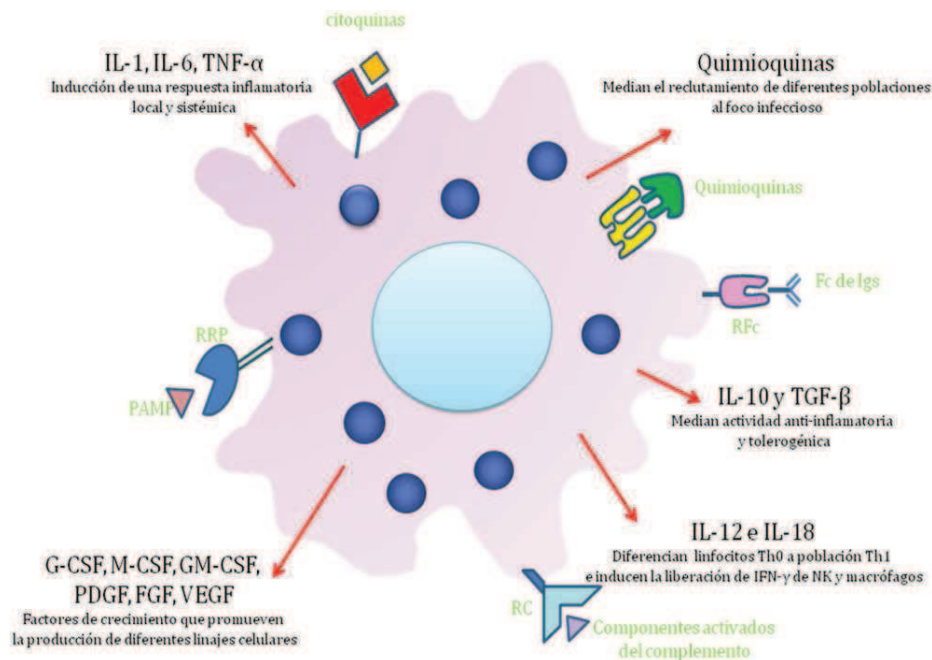


Figura D: Producción de citoquinas y quimioquinas de un macrófago activado. Se indican diferentes receptores (RRP: receptores de reconocimiento de patrones; RFc: receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas; RC receptores para componentes del complemento y receptores para citoquinas y quimioquinas) que al acoplarse con sus ligandos producen su activación.

actividad de macrófagos y otras células en el foco inflamatorio y citoquinas o factores que favorecen la proliferación y/o diferenciación de los precursores linfocitarios en la médula ósea. También produce quimioquinas que median el reclutamiento de leucocitos al tejido lesionado favoreciendo el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

**c- Especies reactivas: ROS y NO;** las especies reactivas de oxígeno (ROS) son sintetizadas por la vía de NADPH oxidasa y liberadas por macrófagos y neutrófilos activados: cuando se producen las ROS dentro de los lisosomas destruyen a los microorganismos fagocitados y células necróticas. Es importante destacar que a bajas dosis pueden aumentar la expresión de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, amplificando de esta manera la cascada de mediadores inflamatorios, pero a altos niveles pueden producir lesión tisular por daño endotelial, activación de proteasas de forma no regulada, entre otros mecanismos.

El NO (óxido nítrico) se produce en varios tipos celulares como músculo liso, células mesangiales, neuronas, plaquetas, fibroblastos, células epiteliales y macrófagos. Es sintetizado *de novo* a partir de L-arginina, oxígeno molecular y NADPH por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Bajo condiciones normales, el NO producido reacciona con el oxígeno y es convertido en nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Puede generar en ciertas condiciones también el radical tóxico peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Se han descrito tres isoformas de la enzima NOS, que fueron nombradas inicialmente según el tejido del cual fueron aislados la proteína original y el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc): NOS neural, también nNOS (NOS I; NOS-1; 160 kDa); NOS endotelial, eNOS (NOSIII; NOS-3; 140 kDa); y NOS inducible, iNOS (NOS II; NOS-2; 130 kDa), aunque actualmente se sabe que las tres tienen una amplia distribución tisular. De todas las isoformas, la iNOS es quien está implicada en los procesos inflamatorios. Se halla presente en macrófagos y células endoteliales, es inducida por numerosas citoquinas y mediadores inflamatorios sobre todo por IL-1, TNF-alfa, IFN- $\gamma$ , lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos, y es la responsable de producir altos niveles del NO que tiene un papel relevante en la respuesta inflamatoria. Esta isoforma también se expresa en hepatocitos, miocitos cardíacos y epitelio respiratorio (Madar Z et. al 2005).

Al NO los macrófagos lo utilizan como un metabolito citotóxico para destruir microorganismos, y cuando es producido por las células endoteliales causa relajación del músculo liso y vasodilatación. También se lo ha implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades

inflamatorias y autoinmunes (Nathan C. et al 1997). Además el NO es responsable de la vasodilatación; adhesión, agregación y degranulación plaquetaria; de la reducción del reclutamiento de los leucocitos al sitio inflamatorio y es agente citotóxico en los macrófagos activados.

**d-Metabolitos del ácido araquidónico: ciclooxigenasas, lipoxigenasas y lipoxinas;** El incremento del calcio intracelular, más la acción de diversas citoquinas, activan el sistema de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en la membrana celular, que en condiciones de homeostasis desempeña un importante papel como antioxidante terciario: A partir de la activación de la PLA<sub>2</sub> se inician 2 grandes vías metabólicas, una a partir del ácido araquidónico (AA) y otra de la glicerofosfolina, las cuales producen como productos finales lipoxinas, leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) y tromboxanos de la primera vía, y factor de activación plaquetaria (PAF) de la segunda. Los metabolitos del AA, también denominados *eicosanoides* se sintetizan a partir de dos grandes grupos de enzimas; las ciclo-oxigenasas (PGs y tromboxanos) y lipoxigenasas (LT, hidroxiácidos y lipoxinas).

A grandes rasgos, los LT se destacan por su papel de fuertes activadores de los neutrófilos y potentes quimiotácticos, mientras que el PAF está reconocido como uno de los más destacados mediadores pro-inflamatorios que induce la producción de TNF, IL-1 y NO y estimula la agregación plaquetaria y la adherencia leucocitaria, mientras produce hipotensión arterial e hipertensión pulmonar. Las principales acciones de las lipoxinas son la inhibición del reclutamiento leucocitario y de los componentes celulares de la inflamación. Inhiben la quimiotaxis de neutrófilos y su adhesión al endotelio.

Las ciclooxigenasas (COX) o prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS) son oxigenasas que catalizan la adición de oxígeno molecular al ácido araquidónico para formar inicialmente el intermediario endoperóxido PGG<sub>2</sub> (actividad ciclooxigenasa). Luego lo reduce a PGH<sub>2</sub> (actividad peroxidasa), que reacciona con varias enzimas isomerasas, para dar prostaglandinas como la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) y 15 –desoxi-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Wu KK. Et al 1995; Smith WL & Marnett LJ. Et al 1991).



Numerosas evidencias avalan la existencia de dos isoformas de esta enzima, COX-1 y COX-2. Estas enzimas son productos de genes diferentes, pero tienen una gran homología e identidad. La COX-1 es constitutiva en la mayoría de los tejidos; la COX-2 es inducible, se encuentra más restringida en cuanto a su ubicación y puede ser inducida por varios estímulos. COX-2 se encuentra constitutivamente, sin embargo, en tejido uterino, nervioso y renal con funciones definidas. Es inducida en macrófagos estimulados, células sinoviales y fibroblastos en respuesta a factores diversos, como citoquinas, como parte de la respuesta inflamatoria. En particular la PGE<sub>2</sub> se propone como un mediador anti-inflamatorio producido por macrófagos junto con IL-10 y TGF- $\beta$  (Voll RE et al. 1997; Fadok VA et al. 1998; McDonald PP et al. 1999; Savill J 1997). Más aún, la remoción eficaz por los macrófagos de células en procesos de apoptosis involucra TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y PAF (Fadok VA et al. 1998).

Las lipoxigenasas llevan a la formación de los leucotrienos LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> o leucotrienos vasoactivos. Los LTs son importantes mediadores de la inflamación. El LTB<sub>4</sub> es un quimioattractante para leucocitos y promueve la adherencia de las células endoteliales, activa la secreción de especies activas del oxígeno y enzimas degradativas de los neutrófilos. Los LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, en cambio, contraen el músculo liso en los territorios vascular, respiratorio e intestinal, causan vasoconstricción, secreción y aumentan la permeabilidad vascular siendo importantes mediadores del asma bronquial.

En cuanto a la regulación entre NO y productos del AA, el NO endógeno modula la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGs). Tanto las COX (ciclooxigenasas) como las lipoxigenasas son enzimas que contienen hierro en el sitio activo de la molécula. Por ejemplo, en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón se demostró que el NO activa COX-2 por un mecanismo independiente de GMPc (Ialenti A et al 1992.). Nuevamente su función sería dual, ya que se demostró que en general, tanto el NO endógeno como el exógeno incrementan la biosíntesis de prostaglandinas en macrófagos de rata (Sautebin L et. al 1995.), mientras que en algunos tejidos, como el oviducto, el NO es capaz de inhibir la síntesis de prostaglandinas (Pérez Martínez S et. al 2000).

Los macrófagos se activan en respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacteriano y/o a la acción de diversas citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-1 y TNF- $\alpha$  (Freudenberg MA et al. 1993; Ma J, et al. 2003), estos factores promueven la expresión entre otros genes de NOS 2 y COX-2 que catalizan la síntesis de NO y PGE<sub>2</sub> que intervienen en la respuesta inflamatoria con actividades opuestas, uno

actuando como pro-inflamatorio y otro como anti-inflamatorio (Nathan C 2001, Levy BD et al. 2001). Dado que la expresión de NOS 2 requiere la activación del factor nuclear kappa B (NF-kB) implicado en procesos inflamatorios, se ha propuesto que este factor es un blanco potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Kleinert H et al 2004)

Además de su función en la respuesta inflamatoria, los macrófagos tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular por su función fagocítica para la remoción de productos de degradación y células apoptóticas. Se los considera 'fagocitos profesionales' por ser los principales responsables de la remoción de células apoptóticas en la mayoría de los órganos (O'Brien BA et. al 2002). Un aspecto clave de su participación en el mantenimiento de la homeostasis es la forma 'silenciosa' y rápida con que los macrófagos eliminan los 'desechos celulares' que, en otro contexto, llevarían a la activación del sistema inmune. Esta función centinela requiere un fino balance de mediadores cuya acción está determinada por su concentración local y su actividad, y que tienen efectos antagónicos o complementarios, como es el caso de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-10 y TGF- $\beta$ , donde TGF- $\beta$  aumenta la producción de IL-10 en macrófagos murinos (Kitani A et al. 2003; Elenkov IJ and Chrousos GP 2002; Ayala A and Chaudry IH 1996)

El proceso de fagocitosis requiere que el macrófago se una al microorganismo o producto y se active para poder emitir el pseudópodo y englobarlo formando el fagosoma. En esta activación interviene la ruta alternativa del complemento donde son importantes los factores C3a y C5a que estimulan los mecanismos dependientes de oxígeno basándose en una liberación de histamina y heparina. Al mismo tiempo se induce la liberación de prostaglandinas y leucotrienos, que intervienen en la fisiología del dolor y vasodilatación.

El proceso de fagocitosis de células apoptóticas a grandes rasgos consiste en:

**1- Acumulación de las células fagocíticas al sitio o quimiotaxis:** se han descrito una variedad de "señales" para distinguir las células apoptóticas de células vivas, en este sentido las células apoptóticas emiten señales quimiotractivas para los fagocitos como MCP-1 de la sigla en inglés *monocyte chemotactic protein-1* produciendo la acumulación de los macrófagos (Nagaosa K

et al 2003), también se cree que las células apoptóticas emiten señales eléctricas producidos por el cambio en la conformación de las membranas celulares (Zhao M et al 2006) que también sirven para atraer a los fagocitos.

**2- Reconocimiento del antígeno:** existen diversos receptores en los macrófagos que reconocen moléculas que pueden ser factores del complemento, inmunoglobulinas y lectinas. A los mecanismos de acercamiento se les llama opsonización. En el proceso de fagocitosis estos receptores llamados opsoninas, se organizan en el amedopio o parte central de la célula fagocítica, en los cuales hay receptores para el fagocito, para el complemento y para las lectinas. Un número significativo de receptores fagocíticos han sido identificados (Peng Y et. al 2007; Gregory CD et al 1998). Uno de los primeros marcadores que aparecen en la superficie en las células apoptóticas es la fosfatidilserina (PtdSer), fosfolípido que se orienta habitualmente hacia la capa interna de la membrana plasmática (Marguet D et al 1999, Schlegel RA and Williamson P 2001). PtdSer aparece en membrana durante estadios muy tempranos de la apoptosis (Fadok VA et al 1992). Se han identificando una gran variedad de receptores, además del receptor de PS (RPS), que pueden reconocer PS, como receptores *scavenger* CD36 (Platt N et al 1996, Henson PM et al.2001.), y CD68 (Erdosova B et al 2002), CD91 o LRP1 entre otros (Savill J et al. 2002).

**3- Ingestión:** proceso por el cual las células son internalizadas en una vacuola, la coenzima nicotinamida adenina-dinucleótido (NAD) pasa de la membrana a la vacuola, se reduce a NADH y activa el proceso de destrucción y degranulación, los lisosomas del fagocito se adhieren al fagosoma y vierten los gránulos al interior del fagosoma con un proceso de fusión de las membranas mediado por el calcio. La ingestión de las células por los macrófagos no induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, por lo tanto, la eliminación de células apoptóticas por los fagocitos es un proceso anti-inflamatorio y activamente inmunosupresor (Meagher LC et al 1992)

**4- Digestión de la partícula endocitada:** pueden intervenir mecanismos dependientes de oxígeno, independientes y dependientes del oxido nítrico  
Existe controversia sobre si intervienen señales de la partícula ingerida tales como la unión a receptores para que se produzca la maduración del fagosoma e digestión, con respecto a esto hay

autores que sugieren que las células apoptóticas son fagocitadas de una manera más lenta y de manera constitutiva para mantener la homeostasis en los tejidos, mientras que las bacterias, por ejemplo, son fagocitadas de una forma más rápida e inducible mediante la señalización de los TLRs (Blander JM et al 2004; Henson PM et al 2006).

### 3- REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Las señales regulatorias o de 'freno' de la inflamación suelen ser versátiles, por lo que se hace tan complicado el desarrollo de las terapias anti-inflamatorias, tal es el caso de PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  entre otros factores que, dependiendo de estadio de la respuesta inflamatoria, pueden actuar como mediadores pro o anti-inflamatorios. A modo de ejemplo, el ácido araquidónico (AA) derivado de los neutrófilos sirve como sustrato para generar, entre otros productos, leucotrieno B<sub>4</sub> y A<sub>4</sub> derivados de 5-lipoxigenasa, quienes tiene acciones pro-inflamatorias, al mismo tiempo el AA en los tejidos genera 15-lipoxigenasa que termina produciendo lipoxinas que actúan como anti-inflamatorias. Asimismo COX-2 inducida en los macrófagos convierte el AA en PGE<sub>2</sub> aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos, pero altos niveles de PGE<sub>2</sub> inhiben tanto la expresión de COX-2 como la de 5-lipoxigenasa induciendo la producción de 15-lipoxigenasa, es decir se convierte de un factor con funciones pro-inflamatorias a anti-inflamatorias (Levy BD et al. 2001). TGF- $\beta$  durante etapas tempranas de la inflamación recluta neutrófilos y en etapas tardías promueve la reparación tisular. También existen otros mediadores versátiles, como IFN- $\gamma$  y TNF (Grobmyer SR, et al. 2000), sugiriendo que para elucidar los mecanismos de regulación no sólo es necesario identificar las señales de encendido y apagado de la respuesta inflamatoria, sino que además -y eso es lo que hace al proceso tan versátil-, se requiere analizar el tiempo y el entorno en que actúan los factores y que definen que éstos se comporten de una u otra manera.

La respuesta inflamatoria, además, puede estar regulada por los sistemas nervioso y endocrino a través de una compleja red de interacciones inmunes-neuroendócrina. Ejemplos de esta interacción y modulación son la demostración del reflejo anti-inflamatorio vagal (Tracey KJ. 2007). Asimismo se ha demostrado una modulación natural de la respuesta inflamatoria asociada a procesos fisiológicos con cambios neuro-hormonales como por ejemplo la gestación: en efecto, se ha visto que glucocorticoides (GC), estrógenos (E<sub>2</sub>), progesterona (P) y andrógenos (A)

modulan la actividad de los macrófagos (Elenkov IJ. 2004; Salem ML. 2004; Jones LA et al. 2008; Nathan C. 2002). Del mismo modo la respuesta inflamatoria puede ser regulada por neuropéptidos: esta regulación se produce durante estadios tempranos de la inflamación, mientras que en fases más tardías intervienen mecanismos específicos como las células T regulatorias.

A modo de ejemplo, los neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) intervienen a diferentes niveles para frenar la inmunidad innata. Pueden inhibir la actividad fagocítica, la producción de radicales libres, quimiotaxis, adherencia y migración de macrófagos y neutrófilos, entre otros; reducir la producción de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 and IL-1 $\beta$ ) y de varias quimioquinas; regular negativamente la expresión de iNOS y por tanto la producción de nitritos por parte de los macrófagos (Lipton JM et al 1997; Delgado M et al 1999; Catania A et al 1996). Asimismo, tanto VIP como  $\alpha$ -MSH estimulan la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, desregulan la expresión de moléculas coestimuladoras en la células presentadoras de antígeno (Luger TA et al 2003; Delgado M et al 2004; Gutiérrez-Cañas I et al 2008). A modo de ejemplo de otros neuropéptidos regulatorios se puede citar a la urocortina, miembro de la familia del factor liberador de corticotrofina, que induce la apoptosis en macrófagos (Tsatsanis C et al 2005) entre otros efectos; o las isoformas PACAP-38 y PACAP-27 de PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria), miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagón, íntimamente relacionado con VIP, con capacidad regulatoria de la respuesta inmune. PACAP y sus receptores pueden tener efectos tanto proinflamatorios (al actuar sobre las células endoteliales durante la fase aguda de la inflamación), como antiinflamatorios, bajo procesos inflamatorios crónicos (Steinhoff M et al. 2003) y si bien también utiliza como receptores a VPAC1 y VPAC2 su afinidad es menor y en cambio posee una afinidad de 300 a 1000 veces mayor por PAC1 (Shivers BD et al. 1991; Inagaki N et al. 1994).

### **3-1 VIP (PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO)**

En 1969 Sami Said y Viktor Mutt reportaron los efectos vasodilatadores de un péptido aislado del tejido pulmonar de cerdo que actualmente recibe el nombre de péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Said SI et al 1969).

VIP es un péptido de 28 aminoácidos miembro de la superfamilia de péptidos de secretina que incluyen: péptido liberador de la hormona de crecimiento (GHRP) y PACAP. VIP presenta una estructura altamente conservada reflejando la importancia de este péptido en la biología animal. A su vez, el VIP es el neuropéptido mas abundante en el sistema inmune y favorece la diferenciación, migración y activación de determinadas subpoblaciones T y de macrófagos con la característica distintiva de inhibir respuestas Th1 y favorecer las Th2 polarizando así la relación Th1/Th2 (Delgado M & Ganea D et al 1999; Delgado M et al 1999; Delgado M et al 1999; Gomariz R et al 2000).

El grupo de Ishihara fueron los primeros en descubrir un receptor de VIP presente en el tejido pulmonar de rata (VIP1) (Ishihara T et al 1992) luego se identificó un segundo receptor homólogo (VIP2) (Lutz EM et al 1993) que, tras diferentes nomenclaturas, se estableció que ambos receptores, presentes en una gran variedad de tejidos, recibieran los nombres VPAC1 y VPAC2 (Harmar AJ et al 1998). Dado que VIP presenta un 68% de homología con PACAP los receptores VPAC1 y VPAC2 unen ambos péptidos aunque con distinta afinidad (Rawlings SR et al 1996). La expresión de VPAC1 ha sido demostrada en distintas poblaciones celulares inmunes (Gomariz RP et al 1993), mientras que la expresión de VPAC2 ha sido demostrada luego de la estimulación del receptor de células T (TCR) en linfocitos o de la estimulación con LPS en macrófagos (Delgado M et al 2002; Gomariz RP et al. 2001). Los receptores de VIP pertenecen al grupo de receptores tipo II acoplados a proteína G, la unión de VIP a VPAC1 o VPAC2 activa la señalización por adenilato ciclasa (AMPc/PKA) y fosfolipasa C que a su vez activan diferentes factores de transcripción (Laburthe M et al 1978; Salomon R et al 1993; MacKenzie CJ et al 1996). En el caso de los monocitos/macrófagos existen evidencias que indican que VIP inhibe las respuestas inflamatorias inducidas por LPS: por ejemplo en macrófagos murinos inhibe la producción de nitritos, TNF- $\alpha$  e IL-12 por un mecanismo dependiente de AMPc (Xin Z et al 1998). También se reportó que VIP puede inhibir las rutas inflamatorias inducidas por LPS a través de mecanismos dependientes o independientes de AMPc (Delgado M et al 1999).

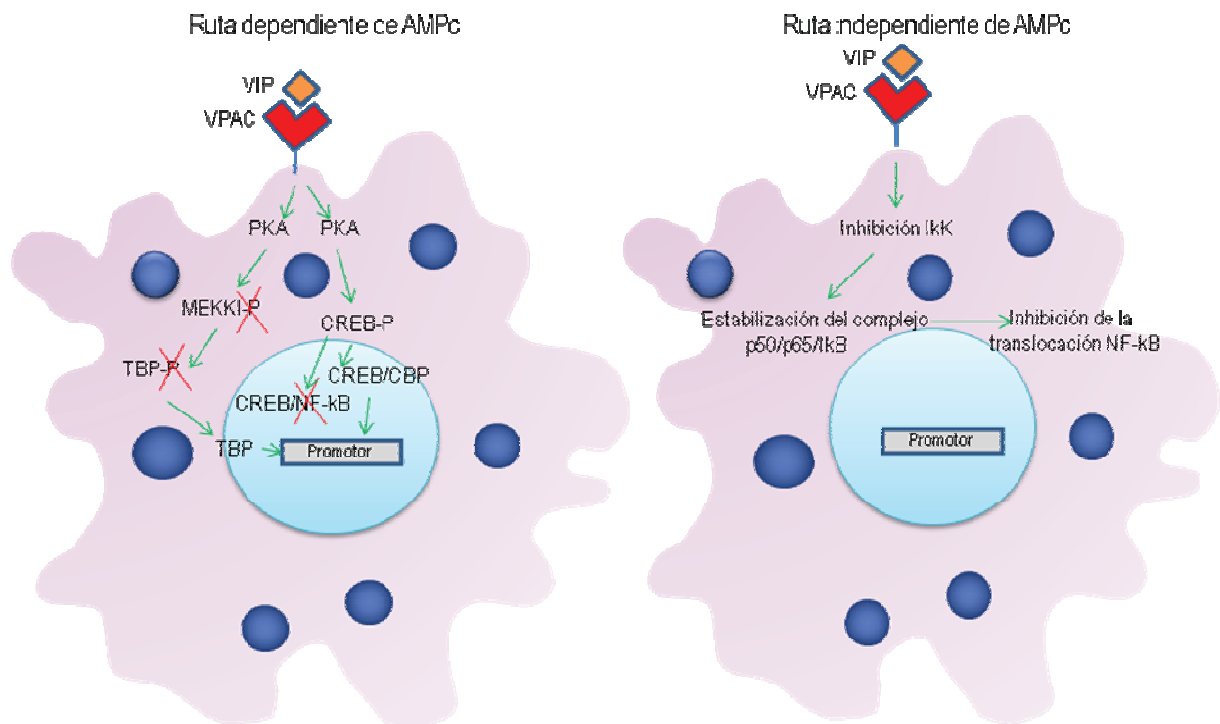


Figura E: Rutas intracelulares inducidas por VIP dependiente e independiente de AMPc: PKA (proteína quinasa A), proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), proteína de unión a CREB (CBP), factor nuclear kB (NF-kB), proteína de unión a caja TATA (TBP), quinasa 1 MAP/ERK (MEKK1).

En las rutas dependientes de AMPc, VIP inhibe la activación de mediadores pro inflamatorios por aumentar la transcripción de factores que compiten por la unión al ADN con factores que activan vías inflamatorias, por ejemplo puede activar proteína quinasa A (PKA) que induce la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) que se une al cofactor CBP (proteína de unión a CREB) aumentando la interacción al DNA y previniendo su interacción con el factor nuclear kB (NF-kB). También puede inhibir la fosforilación de la quinasa 1 (MEK) quinasa, de la vía MAP/ERK también llamada (MEKK1), que inhibe la ruta de p38 aumentando la unión al ADN del cofactor TBP (proteína de unión a TATA-box) que actúa de manera similar a CBP, es decir reduciendo la afinidad de unión al ADN de NFkB (Delgado M et al 2001).

En la ruta independiente de AMPc, VIP inhibe la actividad de la quinasa IκK previniendo la fosforilación de IκB e incrementando la unión del complejo IκB/NFkB en el citoplasma evitando la translocación al núcleo de las distintas subunidades de NFkB (Delgado M et al 2001).



VIP no sólo inhibe la producción de mediadores inflamatorios por parte de los monocitos/macrófagos sino también la capacidad de esas células para reconocer patrones moleculares en los patógenos, por ejemplo regulando negativamente la producción de TLR2 y TLR4 en macrófagos murinos utilizados como modelo de la enfermedad humana de Crohn (Gomariz RP et al 2005), este efecto inhibitorio de VIP sobre los TLRs también tiene una potencial aplicación terapéutica en casos de sepsis.

Se demostró en modelos murinos de pancreatitis que agonistas de VIP disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y amilasa en suero disminuyendo algunos parámetros de la patología (Kojima M et al 2005). En el modelo murino de la enfermedad de Crohn (colitis inducida con ácido trinitrobencenosulfónico:TNBS) la administración de VIP mejora las señales clínicas de la enfermedad y las lesiones histopatológicas asociadas a ésta (Arranz A et al 2008). En un modelo de artritis reumatoidea se observó que la administración de VIP previene el daño crónico del cartilago y remodela las articulaciones (Delgado M et al 2001). Recientemente se demostró que las células dendríticas inducidas con VIP protegen del rechazo agudo característico de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en el modelo murino de trasplante de medula ósea alogénica. A nivel sérico, el tratamiento de VIP redujo el nivel de citoquinas pro-inflamatorias en los ratones post trasplante alogénico (Chorny A et al 2006).

El tratamiento de ratones NOD con VIP disminuyó el índice de diabetes y la severidad de la insulinitis. Este efecto protector se debió principalmente a una disminución de citoquinas Th1 en suero y a una diferenciación funcional de células T regulatorias en el páncreas con aumento Foxp3 y TGF- $\beta$ , y disminución del marcador de diferenciación Th1, T-bet (Rosignoli F et al 2006; Gonzalez Rey E & Delgado M et al 2007).

Además de sus acciones rápidas sobre la secreción exócrina, la liberación hormonal, la relajación muscular, y sus efectos inmunomoduladores promoviendo respuestas Th2, el VIP se ha caracterizado como un regulador del crecimiento fetal y el desarrollo embrionario. Se ha descrito un efecto anti-apoptótico del VIP en tejido nervioso neonatal en el período crítico de génesis de astrocitos y el tratamiento de ratones neonatos con un antagonista del VIP altera la supervivencia y maduración neuronal (Zupan V et al 2000). Tiene un notable efecto inductor del crecimiento embrionario, por acortamiento de las fases G1 y S del ciclo celular neural (Gressens P et al 1998) y se observó un aumento de VIP en circulación en madres en el período peri-implantatorio (Hill JM



et al 1996). Si bien los efectos de VIP como factor de crecimiento se manifiestan durante toda la gestación tanto en el período embrionario como fetal, sin embargo, en el período embrionario entre los días 9 y 12 de gestación, la fuente de VIP es únicamente el tejido decidual materno (Spong CY et al 1999).

Aunque sus propiedades y potencial terapéutico se basan en numerosas evidencias, su escasa biodisponibilidad –es rápidamente aclarado del plasma por enzimas proteolíticas- reduce por el momento este potencial y ha impulsado la modificación química de la molécula, su inclusión en formas farmacéuticas modernas así como el desarrollo de pequeñas moléculas basadas en su estructura que simulen su acción. En este campo se hallan trabajando laboratorios farmacéuticos con resultados variables en ensayos preclínicos y en el tratamiento de trastornos respiratorios en pacientes (Dangoor D et al.; Ohmori Y et al 2006; Onoue S et al 2007).

### **3-2 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DURANTE LA GESTACIÓN**

La regulación inmune-neuroendocrina del diálogo materno-fetal juega un papel importante tanto en la implantación como en el desarrollo de la placenta, promoviendo la tolerancia fetal. En 1984, Wegmann propuso que “la preñez es un fenómeno Th2”. Esta hipótesis se basaba en que la preñez es un fenómeno de tolerancia materna a un feto alogénico y por lo tanto requeriría bajos niveles de citoquinas Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), consideradas “deleterias”, y altos niveles de citoquinas Th2 consideradas protectoras. Sin embargo, en la actualidad, se propone que las citoquinas de tipo Th1 también son necesarias para la gestación.

Se ha demostrado en ratones y humanos, que un microentorno pro-inflamatorio es necesario en la primera etapa de la preñez, particularmente en el momento de la implantación, donde la respuesta inflamatoria se asocia con la expresión de moléculas de adhesión en el trofoblasto y la decidua (Chaouat G et al 2002.). Una regulación fina de la actividad de las citoquinas Th1 y otros mediadores pro-inflamatorios en la etapa inicial es esencial para el mantenimiento de la gestación. Así, cuando la activación de la respuesta Th1 está exacerbada se asocia a una mayor reabsorción embrionaria en humanos y en roedores. Consistente con ello, altos niveles de citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 y la endotoxina LPS (lipopolisacárido bacteriano) aumentan la reabsorción en ratones (Chaouat G et al 1990). En contraste, la producción de IL-10 por los leucocitos maternos y por el trofoblasto parece ser fundamental para el éxito de la preñez a tal punto que la administración de anticuerpos bloqueantes anti-IL-10 a ratones preñados aumenta la frecuencia de reabsorción

(Szekeres-Bartho J et al 1996). Más aún, el efecto de la IL-10 está asociado en parte a la regulación de la producción local de óxido nítrico (Ogando D et al 2004).

Las citoquinas producidas, tanto por células inmunes como por células no inmunes en la interfase materno-fetal, y dependiendo de sus niveles locales, regularían así una amplia gama de procesos incluyendo la remodelación tisular, la neovascularización y la defensa ante patógenos (Chaouat G et al 2007). Por ejemplo, una citoquina asociada a respuestas Th1 y a efectos proabortivos, como es el IFN- $\gamma$ , en bajas dosis ha sido involucrada en la inducción de la neovascularización (Wira CR et al 2005; Croy BA et al 2002).

Los macrófagos constituyen el 20-30% de las células inmunes deciduales (Kabawat SE et al 1985; Abrahams VM et al 2004) y, a diferencia de las células NK, se mantienen altos durante toda la gestación, sugiriendo que no sólo tienen un papel de defensa contra patógenos sino también participan de procesos como la remodelación tisular cumpliendo funciones homeostáticas mediante la remoción de cuerpos apoptóticos originados durante dicha remodelación. Estas funciones promueven un microentorno adecuado para el crecimiento y la invasión trofoblástica a través de apoptosis y en ausencia de una respuesta inflamatoria deletérea (Abrahams VM et al 2004). La interacción trofoblasto-macrófago durante una gestación normal contribuye al cambio Th1-Th2 además de remover cuerpos apoptóticos (Abrahams VM et al 2004). Una eliminación ineficiente de los agentes infecciosos, o una respuesta inmune exacerbada, pueden contribuir a desórdenes en la gestación que incluyen la preeclampsia, el parto prematuro y el aborto.

#### 4- MODELO NOD

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) ofrecen un modelo interesante para estudiar procesos de mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular y respuesta inflamatoria que pueden conducir a pérdida de tolerancia y autoinmunidad.

Esta cepa surgió como una sublínea de los ratones ICR (Institute of Cancer Research) (Makino S et al 1980), que a partir de la progenie de una hembra que desarrolló espontáneamente *diabetes mellitus* dependiente de insulina (IDDM), la crianza selectiva de esta progenie llevó en la sexta generación al establecimiento de la cepa NOD/Lt.

A partir de las 12 semanas, en el estado prediabético, desarrollan una sialadenitis espontánea a predominio Th1 con pérdida de la función secretoria, semejante en algunos aspectos al Síndrome de Sjögren en humanos (Miyagawa J et al 1986; Humphreys-Beher MG et al 1994; Yamano S et al 1999). El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica autoinmune que se caracteriza por alteraciones histológicas y funcionales de las glándulas exócrinas, en el marco de una respuesta inflamatoria variable, que resultan en una severa disminución de la secreción salival y lagrimal conocidas clínicamente como xerostomía y xeroftalmia y también como síndrome *sicca* (Strand V. and Talal N., 1980; Manthorpe R, Jacobsson LT 1995; Fox R.I. and Michelson P., 2000).

Algunos autores han propuesto que esta disfunción secretoria se debe a daños estructurales en las células acinares de las glándulas exócrinas y se ha observado una pobre correlación entre la baja densidad y distribución de los infiltrados linfomononucleares en glándulas de pacientes y la significativa disminución en la secreción salival (Fox RI & Michelson P et al 2000). Esta observación llevó a sugerir que alteraciones en las vías regulatorias neurales, o pérdida de la homeostasis tisular en etapas tempranas con producción de mediadores de la respuesta inflamatoria, podrían participar en la patogénesis del síndrome *sicca*.

En el modelo NOD, el desarrollo de la sialadenitis parece estar asociado a múltiples defectos regulatorios en las glándulas (Anderson MS & Bluestone JA et al 2005; Piccirillo CA et al 2005). Del mismo modo que en los pacientes, en el modelo espontáneo de respuesta Th1 de los ratones NOD, durante la etapa prediabética, no se encontró una correlación entre la severidad de la disfunción secretoria y la moderada respuesta inflamatoria en las glándulas (Yamamoto H et al 1997). La activación aberrante por parte de las células del epitelio glandular ha sido propuesto como el inductor y perpetuador de la respuesta inflamatoria (Manoussakis MN & Moutsopoulos HM et. al 2000). Consistente con la hipótesis de alteraciones nerviosas y funcionales más que inmunes en el inicio de la enfermedad, se ha descrito un aumento en la expresión de metaloproteasas (Robinson CP et al 1997), de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Hu et al. 1994) y de intermediarios proapoptóticos (Kong L et al 1998) en las glándulas salivales de ratones NOD. En línea con estos hallazgos, se demostró una alteración en la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en glándulas salivales de ratones NOD prediabéticos (Rosignoli F et al 2001, 2004), una menor respuesta secretoria y de AMPc al VIP (Rosignoli F et al 2002), todos efectos que preceden

a la aparición de infiltrados en las glándulas y al desbalance Th1/Th2 en suero, en esplenocitos y en el propio tejido exócrino (Rosignoli F et al 2005).

Se ha propuesto un modelo de 2 fases para explicar la patología en los ratones NOD, la iniciación de la enfermedad ocurre en forma independiente de la respuesta inmune y se caracteriza por apoptosis de células epiteliales. Esta primera etapa es seguida por una segunda donde se produce el infiltrado y el daño tisular (Kong L et al 1998.). Los autores sugieren que el gatillo inicial estaría mediado por un defecto en la homeostasis salival (Robinson CP, et al 1996). Además los ratones NOD presentan un menor número de células T regulatorias, aunque mantienen su capacidad represora ya que en caso de depleción se acelera el progreso de la enfermedad. La disminución en nódulos linfáticos e islotes pancreáticos de hembras NOD es dependiente de la edad y no se observa en machos, sugiriendo un rol de las hormonas sexuales en su regulación (Pop SM et al 2005). Estudios en pacientes con SS, donde se demostró la activación de células epiteliales glandulares, también coinciden con esta hipótesis (Manoussakis MN & Moutsopoulos HM. 2000; Dimitriou ID et al 2002).

Se ha observado en esta cepa un aumento de la apoptosis y de la sensibilidad a proceder a apoptosis por parte de los acinos de glándulas salivales de las hembras (Calafat et. al 2009) y también un aumento de apoptosis de tejido nervioso en el páncreas (Saravia & Homo-Delarche. 2003). Asimismo, se han descrito defectos en la actividad fagocítica de los macrófagos enfrentados a células apoptóticas en edades muy tempranas (O'Brien et. al 2002).

Finalmente, en el modelo NOD prediabético se observó una disminución de la tasa de natalidad y procesos de reabsorción embrionaria (Burke et. al 2007, Lin Y et. al 2005, Roca et. al 2009). A partir de la semana 16-18 de vida en esos casos hemos observado que a los 9 días de gestación la reabsorción embrionaria se asocia a menores niveles de VIP en los sitios de implantación, aumento de NO y PGE2 y disminución de células T reg en los mismos sitios, que se hace más pronunciada en los sitios con procesos de reabsorción (Roca V et al 2009).

**Hipótesis:**

Las alteraciones en el perfil de activación y la función de los macrófagos de ratones NOD pueden ser moduladas por VIP y durante la gestación.

**Objetivo general**

Estudiar el perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD frente a estímulos inflamatorios y fagocíticos, su modulación por VIP y durante la gestación temprana.

**Objetivos específicos**

- Estudiar el perfil de activación de los macrófagos NOD frente al LPS, a timocitos apoptóticos y a acinos apoptóticos obtenidos de glándulas submaxilares de ratones NOD durante el estadio prediabético.
- Evaluar el efecto de VIP sobre macrófagos frente a los diferentes estímulos y las vías de señalización que involucran al factor NF- $\kappa$ B.
- Analizar posibles cambios en el perfil de activación y la función de los macrófagos en la preñez temprana.

## ***Materiales y Métodos***

### **1. Animales utilizados.**

Se utilizaron ratones de la cepa NOD (diabéticos no obesos) y como controles ratones BALB/c del mismo sexo y edad. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz y oscuridad (12:12) y temperatura constantes, en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron monitoreados para determinar los niveles de glucosa en sangre y considerados pre-diabéticos normoglucémicos, ya que sus niveles de glucosa, tomados 2 veces en un período de 24hs, no variaron significativamente de los controles ( $1,0 \pm 0,1$  g/l, n=23) (Wiener. Rosario, Argentina).

Todos los ensayos se realizaron con los animales mantenidos en ayunas por 18 horas con agua *ad libitum* y de acuerdo a los protocolos estándares establecidos por el Comité de Ética y Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Para los ensayos con hembras vírgenes se realizaron extendidos vaginales para determinar el estadio del ciclo estral al momento de realizar los experimentos. Para ello se colocó en la vagina del ratón una pipeta Pasteur con un tip estéril cargada con PBS, se dejó que el líquido penetrara y luego se aspiró el contenido vaginal, colocándolo sobre la superficie de un portaobjetos. Se observó al microscopio óptico con bajo aumento (100x). La duración del ciclo estral en la cepa NOD es de 4-5 días similar en duración y características al ciclo estral de las hembras BALB/c, donde, en proestro las células presentes en el extendido son predominantemente de tipo epitelial, nucleadas y redondas. En estro se encuentran células epiteliales con aspecto escamoso, de borde irregulares que forman agregados. En metaestro, se observa un número mayor de células epiteliales con regular número de leucocitos, mientras que en diestro las células predominantes son leucocitos y presentes en gran cantidad. Todas características similares a las informadas en ratones control de distintas cepas.

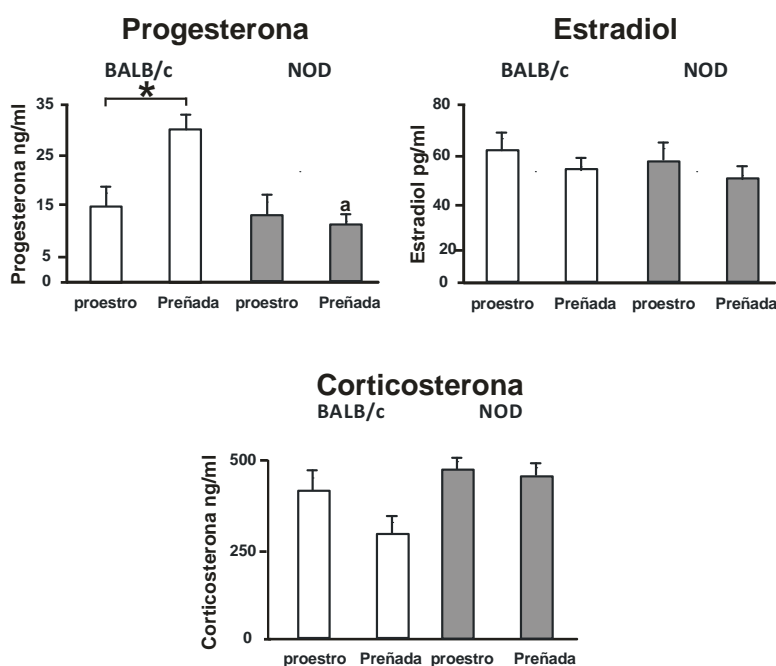
Para los ensayos con hembras preñadas, se colocaron en apareo hembras de 15-16 semanas de edad con machos de la misma cepa. La cópula se constató por observación de la presencia o ausencia de tapón mucoso vaginal. A partir de la observación del tapón se separó a las hembras y se las mantuvo con agua y alimento *ad libitum* hasta el día 9 de preñez en que fueron utilizada en todos los experimentos.

Para la obtención de timocitos además se usaron machos de la cepa NOD y BALB/c de 21 días de edad obtenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

## 2. Caracterización del modelo NOD

### 2.1 Perfil hormonal: progesterona, estradiol y corticosterona en hembras vírgenes y preñadas.

Estudiamos la concentración de las hormonas en el suero de hembras NOD y BALB/c durante los estadios proestro y diestro del ciclo estral: el suero obtenido de cada hembra fue clasificado según el estadio del ciclo en que se encontraba y analizado por separado para la detección de progesterona (P4), estradiol (E2) o corticosterona por RIA. La elección de estos 2 estadios se basó en que ocurren las mayores diferencias en los niveles de progesterona y estradiol en el suero. No encontramos diferencias significativas en los niveles de P4 o E2 en proestro y diestro, entre las hembras de ambas cepas (se muestran sólo los resultados en proestro). Asimismo, la determinación de corticosterona no varió en ninguno de los estadios y también fue comparable entre BALB/c y NOD (figura página 34). Las hembras preñadas, en cambio, mostraron diferencias en sus perfiles hormonales. La figura muestra que en las hembras NOD preñadas no se observa el ligero descenso de corticosterona sérica que aparece en las hembras preñadas BALB/c.



#### Niveles de Progesterona, Estradiol y Corticosterona en el suero de hembras BALB/C y NOD vírgenes y preñadas.

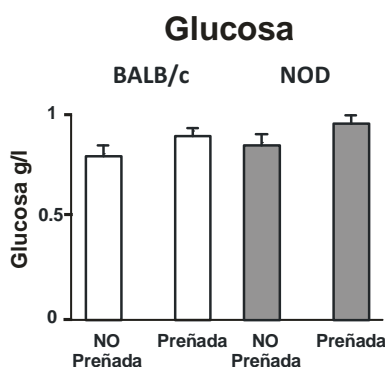
Los niveles de progesterona, estradiol y corticosterona en el suero de hembras NOD y BALB/c se midieron por la técnica de RIA. Los valores representados son la media  $\pm$  ES de al menos 5 hembras. \* $P < 0.05$ , (a)  $P < 0.05$  vs. BALB/c preñada.

La misma figura, también muestra que el estradiol sérico no cambia entre hembras vírgenes y preñadas ni entre BALB/c y NOD; mientras que la P muestra un significativo descenso en la concentración plasmática en hembras NOD preñadas comparadas con las BALB/c consistente con resultados previos en esta colonia (Roca et. al 2009)

### 2.2 Niveles de glucosa en sangre

En trabajos publicados por distintos grupos se informa que los niveles séricos de glucosa aumentan significativamente durante la vida de las hembras NOD. Dependiendo de las condiciones de cría y mantenimiento en el bioterio, el inicio y la incidencia de diabetes en la cepa NOD varía desde la semana 12 a semanas posteriores a la 30 y con una incidencia del 20% al 70%. Hay un mayor consenso en cuanto a que el inicio de la hiperglucemia se registra posterior a la semana 22 con una incidencia relativamente baja (<30%) que llega a un 70% en la semana 30 de edad de las hembras NOD (Homo-Delarche. 2004). La edad de inicio de hiperglucemia para la colonia NOD mantenida en nuestras condiciones de cría varía entre las 25 y 30 semanas, con una incidencia >50% y niveles de glucemia entre 1,6 y 2,4 g/l en ayunas alrededor de la semana 30. En las hembras utilizadas en estos experimentos, monitoreamos la concentración de glucosa en sangre en cada hembra teniendo en cuenta el estadio del ciclo en que se encontraba. Las hembras NOD de 16 semanas de edad usadas no presentaron diferencias significativas en los niveles de glucosa en suero en los distintos estadios del ciclo estral, ni con respecto a los ratones BALB/c de la misma edad utilizados como controles, referidas en adelante como hembras NOD prediabéticas. La glucemia no se modifica en hembras vírgenes ni en el día 9 de gestación (ver figura de la página 35).

Del mismo modo que otros autores, la observación de cortes histológicos de páncreas indica que a las 16 semanas de edad, el grado de insulitis de esta colonia (score) es menor a 1y las imágenes son consistentes con peri-insulitis en menos de un 10% de la superficie del islote comprometida con infiltrados linfocitarios. (resultados no publicados).



Niveles de glucosa en el suero de hembras BALB/C y NOD vírgenes y preñadas.



## 2.3 Tasa de flujo salival

La tabla B muestra la secreción inducida con pilocarpina en hembras NOD en proestro y preñadas. La diferencia que se observa entre NOD y BALB/c (Rosignoli et. al 2002, 2005) no se revierte en el día 9 de gestación de las NOD.

Flujo Salival ( $\mu\text{l}/\text{min} \times 100\text{g}$ de peso)	BALB/c		NOD	
	No Preñada	Preñada	No Preñada	Preñada
	60.0 $\pm$ 2.0	62.4 $\pm$ 3.0	42.1 $\pm$ 3.2*	43.35 $\pm$ 5.2*

**Tabla B. Determinación del flujo salival de hembras BALB/C y NOD vírgenes y preñadas.**

Los valores representados son la media  $\pm$  ES de al menos 3 hembras. \*P<0.05 vs. correspondiente columna en BALB/c

## 2.4 Perfil de citoquinas en suero

En ratones NOD en las condiciones de cría de nuestra colonia medimos la concentración de distintas citoquinas en suero durante el ciclo estral. Observamos un aumento significativo de los niveles de IL-12 y TNF- $\alpha$ , dos citoquinas del tipo Th1, en el suero de las hembras NOD de 16 semanas comparadas con hembras BALB/c. En cambio, no encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-10 séricos entre ambas cepas y tampoco niveles detectables de IFN- $\gamma$  en ninguna de ellas. Cabe destacar que no observamos variaciones en los niveles de citoquinas séricas entre los distintos estadios del ciclo estral en ratones NOD ni en ratones BALB/c (Roca et. al 2006).

Las hembras NOD de 16 semanas vírgenes criadas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y empleadas en este trabajo se encuentran en un estadio pre diabético, presentan un ciclo estral normal y no se observaron variaciones significativas en los niveles de corticosterona, progesterona ni estradiol con respecto a las hembras BALB/c. Presentan un aumento significativo en el perfil de citoquinas del tipo Th1 en suero con respecto a las hembras BALB/c. Puestas en apareo en estas condiciones presentan una disminución en el número de crías por camada comparadas con distintas cepas de ratones normales, como hemos descrito en coincidencia con otros laboratorios (Roca V et. al 2009, Lin et. al 2008, Burke et. al 2007). Tal disminución está asociada a un aumento en la tasa de reabsorción embrionaria ligada a una reducida actividad de células T regulatorias local (Roca et. al 2009; Lin et. al 2008)

## 3. Cultivos primarios y co-cultivos:

### 3.1 Macrófagos peritoneales

Para la obtención de macrófagos peritoneales se sacrificaron los ratones por dislocación cervical previo sangrado. Los macrófagos fueron obtenidos de la cavidad abdominal en condiciones de reposo, sin estímulo previo, por inyección intraperitoneal de una solución de 3 ml de Hanks completo (Gluc 5,5mM + ClNa 136,7mM + ClK 5,3mM + H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 0,3mM + HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.H<sub>2</sub>O 0,3mM + NaHCO<sub>3</sub> 4,16mM pH 7,2 + 10% SFB y 1% de ATB (penicilina-estreptomicina) (Gibco)) frío, la zona peritoneal fue masajeada durante 2 o 3 minutos y el contenido fue recuperado con una jeringa y centrifugado durante 10 min a 1400 g. Luego de la centrifugación las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (GIBCO-INVITROGEN) con 10% SFB, 1% de ATB; una pequeña suspensión de las mismas (dil 1/10) fue cuantificada con Tripan Blue en cámara de Neubauer. Luego de la cuantificación,  $5 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  células, con 95 % de viabilidad, fueron incubadas según el experimento a realizar a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> durante dos horas en placas de 96 o 24 pocillos. Pasado ese tiempo, las placas fueron lavadas dos veces con Hanks completo e incubadas con medio RPMI 1640 completo (con SFB 10%), por los tiempo indicados. Los macrófagos fueron tratados con LPS + IFN- $\gamma$ , VIP, anti-IL-10, PGE<sub>2</sub> y otros tratamientos que se indican en Resultados a las concentraciones finales. Como se trabaja en condiciones de reposo, es decir sin ningún estímulo inflamatorio in vivo previo como puede ser tioglicolato, el número de macrófagos extraídos es 1 o  $2 \times 10^6$  células/ratón, por lo cual decidimos, luego de realizar los controles pertinentes, trabajar con *pool* de macrófagos de 4 a 6 ratones de cada cepa en cada experimento.

#### - Drogas empleadas en los tratamientos de los cultivos de macrófagos

- LPS (1-20 $\mu$ g/ml) (LPS: Lipopolisacárido de *Escherichia coli* 055:B5. (L4005), Sigma Chemical Co.) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) (BD Pharmigen)
- VIP ( $10^{-9}$  -  $10^{-7}$ M) (NeoMPS)
- Antagonista de VIP (híbrido de neurotensina y VIP (H-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub>) ( $10^{-5}$  M) (Peninsula-Bachem Inc ).
- IL-10 (75 U/ml) (BD Pharmigen)
- PGE<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-8}$ M) (Amersham Corporation)
- INDO ( $10^{-6}$ M) (Laboratorios Montpellier)
- Sulfasalazina (500 $\mu$ M) (Sigma Chemical Co.)
- MG 132 (inhibidor del proteasoma), 20  $\mu$ M (Calbiochem)
- H89 (0.1 $\mu$ M) (Sigma Chemical Co.)
- Wortmanina (200nM) (Sigma Chemical Co.)

Cuando se usaron inhibidores fueron, agregados a los cultivos durante 30 min, previo al agregado del estímulo o tratamiento.

### **3.2 Timocitos e inducción de la apoptosis**

Ratones machos de las cepas NOD y BALB/c fueron mantenidos en condiciones controladas con libre acceso a comida o agua. A los 21 días de edad fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el timo que fue disgregado en solución de Hanks, las células fueron centrifugadas a 625 g durante 5 min en frío y resuspendidas en medio RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de ATB (penicilina/estreptomicina) (Gibco) conteniendo además Concanavalina A 2  $\mu$ M (Sigma-Aldrich).  $1 \times 10^6$  timocitos fueron cultivados en placas de 24 pocillos (NUNC) en un volumen final de 1 ml de RPMI 1640, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

La apoptosis de los timocitos se indujo con dexametasona (Sigma-Aldrich) en una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  durante cuatro horas. Luego de la incubación los sobrenadantes fueron recuperados, centrifugados por 5 min a 625 g en frío y las células resuspendidas en medio RPMI 1640 + 10% SFB y reservadas para realizar los cocultivos.

### **3.3 Cultivo primario de acinos**

Las glándulas submaxilares fueron removidas e inmediatamente transferidas a RPMI 1640 + 10 % SFB.

Para cada experimento los tejidos, procedentes de unas 10 glándulas submaxilares obtenidas tanto de hembras de 16 semanas BALB/c y NOD, fueron fraccionadas y digeridas en 2,5 ml de RPMI que contiene colagenasa IV 100 U / ml (Sigma), 10% SFB y 0,1 g / L de inhibidor de tripsina de soja a 37 °C con agitación en un baño de agua durante 10 minutos (120 ciclos / minuto) y disgregadas con una pipeta de plástico y filtradas a través de una malla de nylon (150 mallas). Las células acinares se centrifugaron tres veces a 400 g durante 10 segundos con medio RPMI fresco + 10% de SFB. Se sembraron en placas de 24 pocillos con fondo plano y se incubaron durante dos horas en 37 °C en un incubador humidificado con un 5% dióxido de carbono para separar células glandulares inmunes adherentes. La suspensión purificada presentó una población homogénea de células acinares con una presencia mínima (menos del 5%) de células inmune mononucleares. La viabilidad de la suspensión celular fue obtenida por tinción con naranja de acridina / Ioduro de Propidio y Azul Tripan. Los acinos aislados son utilizados para la realización de los cocultivos.

## **3.4 Co-cultivos**

### **3.4.1 Macrófagos y timocitos.**

Los macrófagos peritoneales y los timocitos fueron obtenidos como se menciona mas arriba y fueron co-cultivados en una relación 1:5 ( $0.25 \times 10^6$  macrófagos:  $1.25 \times 10^6$  timocitos homólogos) durante distintos tiempos (0, 30, 60 y 90 min). En ciertos ensayos se colocó un cubreobjeto en el fondo de la placa (24 pocillos) con el fin de adherir los macrófagos y poder realizar los tratamientos para microscopía. Luego de esos tiempos los timocitos fueron recuperados y los macrófagos peritoneales adheridos en el vidrio o fondo de la placa fueron lavados 3 veces con Hanks y fijados con metanol o tratados para las diferentes determinaciones realizadas bien frío

### **3.4.2 Macrófagos y acinos.**

Al cultivo de macrófagos peritoneales extraídos y sembrados en placas de 24 pocillos se les agregó la suspensión de acinos aislados en cocultivos homólogos (100-150  $\mu$ g de proteínas totales). Dicha preparación se obtuvo como se indica en 3.3 y presentaba un 40 % de células apoptóticas evaluadas por Hoescht como se describió previamente (Calafat et. al 2009). Los cocultivos se realizaron por 30 y 90 min a 37 °C al cabo de los cuales se descartaron los Acinos, se lavaron tres veces con Hanks y se usaron para las diferentes determinaciones por microscopía.

## **4. Producción de mediadores:**

Los co-cultivos de macrófagos peritoneales y timocitos 1:5 ( $0.5 \times 10^6$  macrófagos:  $2.5 \times 10^6$  timocitos) se emplearon también para la determinación de mediadores. Luego del estímulo los timocitos fueron recuperados y los macrófagos peritoneales adheridos en el fondo de la placa, fueron lavados 3 veces con RPMI y cultivados con medio RPMI completo fresco a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 hs. Terminado ese tiempo los sobrenadantes fueron recolectados para determinar la producción de citoquinas, prostaglandinas y nitritos.

### **4.1. Determinación de nitritos**

En los sobrenadantes obtenidos tanto de los co-cultivos o de los cultivos de macrófagos peritoneales tratados como se indica en resultados, se determinaron los niveles de nitritos utilizando el método de Griess. Brevemente, 100ul de muestra y del reactivo de Griess (solución A + solución B) se incuban en microplacas (NUNC) durante 10 min a temperatura ambiente y se determina la absorbancia a 540 nm. La concentración de las muestras se obtiene interpolando los valores en una

curva Standard de  $\text{NaNO}_2$ . La curva es lineal hasta 250 micromolar. Solución A: 0.1 g de N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride (Sigma Chemical Co.) en 100ml de agua destilada. Solución B: 1g de sulfanilamida (Sigma Chemical Co.) en 100ml de ácido fosfórico al 5%

Ambos reactivos se guardan a 4 °C, protegidos de la luz.

### **4.2 Determinación de citoquinas.**

#### **4.2.1 ELISA**

Los niveles de citoquinas (IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ ) se determinaron mediante la técnica de enzimo-inmunoensayo (ELISA) (Juarranz et al 2004); en algunos casos para la determinación de TNF- $\alpha$  se realizó la técnica por un ensayo biológico que se detalla en el siguiente punto. Para la determinación de citoquinas, se utilizan los sobrenadantes, obtenidos tanto de los co-cultivos como de los cultivos de macrófagos peritoneales tratados como se indica en resultados.

Para los ELISA, las microplacas de fondo plano y alto pegado (NUNC) fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-ratón de captura para IL-10, TNF $\alpha$  e IL-12 (BD Pharmigen) 2 $\mu\text{g/ml}$  a 4 °C en cámara húmeda durante toda la noche. Luego de lavar y bloquear con solución de bloqueo (PBS-3% BSA), las muestras y citoquinas recombinantes fueron incubados durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Luego de lavados (PBS-Tween), las placas se incubaron en presencia de anticuerpos biotinilados específicos para cada citoquina (BD Pharmigen) (2 $\mu\text{g/ml}$ ) a temperatura ambiente, en cámara húmeda, por 45 min. Finalmente se lavaron las placas nuevamente y se incubaron con Streptoavidina-HRP (1:2000) a temperatura ambiente, en cámara húmeda, 30 min. El sustrato utilizado fue OPD en solución de revelado por 20 min y la reacción se detuvo con solución de STOP ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N). La densidad óptica se determinó a 450 nm mediante un lector de placas (Bio Rad model 680) y los resultados se expresaron en ng/10<sup>6</sup> células. Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. El método posee una variabilidad intra-inter ensayo menor al 5%.

#### **4.2.2 Ensayo biológico para TNF- $\alpha$**

En algunos ensayos se empleó un ensayo biológico para determinar TNF- $\alpha$ , que permite evaluar también su actividad. Se realizaron cultivos celulares de la línea L929 en placas de 96 pocillos. Se sembraron 15.000 células por pocillo y se las dejó crecer por 24 horas hasta llegar a una confluencia del 80% en medio de cultivo esencial mínimo (MEM) de baja glucosa (2%) (GIBCO-INVITROGEN). A las células sensibilizadas con actinomicina D (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) (SIGMA-ALDRICH) se les agregaron las muestras a determinar TNF, standards o los sobrenadantes con los diferentes

tratamientos o con solución fisiológica en diluciones seriadas. Una vez estimuladas, las células se dejaron crecer por 16 horas y luego de tinción con cristal violeta se extrajo el colorante incorporado con una solución de ácido acético al 33% y se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 535 nm en un lector de ELISA (Bio Rad model 680). La absorbancia se correlaciona en forma directa con la concentración de colorante que se correlaciona a su vez con la cantidad de células vivas presentes en el pocillo en el momento de realizar la tinción. Los resultados se expresaron en pg/10<sup>6</sup> células.

### **4.3 Producción de PGE<sub>2</sub>.**

El nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) liberado por los macrófagos se estudió mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) con un anticuerpo específico (CAYMAN) (Jaffe y Behrman 1974). Los sobrenadantes obtenidos de los co-cultivos y de los cultivos de macrófagos peritoneales fueron extraídos y reconstituidos en buffer RIA de PGs (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 7,3mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,7mM + NaCl 154mM + albúmina bovina 7,1mM + azida sódica 15,4mM. pH 7.4). A partir de una solución madre de PGE<sub>2</sub> (Sigma Chemical Co.) se construyó la curva de calibración haciendo diluciones seriadas al medio (15 - 4000 pg). Luego de la adición del antisuero se incubó 30 min a 4 °C, se adicionó la prostaglandina marcada (Amersham: [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-<sup>3</sup>H]-prostaglandina E<sub>2</sub> (130 Ci/mmol, 100μCi/ml) y se incubó durante 1 h a 4 °C. se separó PGE<sub>2</sub> libre y unida por el agregado de una suspensión de carbón activado (1%) – dextrán (0.1%) seguido de una centrifugación a 2000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se volcó en viales con 2 ml de líquido de centelleo (Optiphase Hi-Safe III de Perkin Elmer) para muestras acuosas. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman). Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. Los datos se expresaron como pg PGE<sub>2</sub> / 10<sup>6</sup> células / 1h. El método posee una sensibilidad de 5 pg/tubo y la reactividad cruzada es menor al 0.1%

### **4.4 Expresión de NOS 2 y COX-2**

Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron recuperadas utilizando una solución 2mM de EDTA frío y centrifugadas a 1400g a 4 °C y posteriormente lavadas con PBS frío. Los botones celulares obtenidos se re suspendieron en buffer de extracción con inhibidores de proteasas (TRIS-HCL ph 7.5, NaCl 137mM, EDTA 10 mM y NP40 1%) (PMSF 17.4 ug/ml y Leupeptina 2 ug/ml) (Sigma Chemical Co.) y se incubaron 1 hora en hielo, luego se realizó una centrifugación de 20 min a 12000 G y se recuperó el sobrenadante que fué congelado a -70 hasta utilizarlo para Western Blot.

## 5. Fagocitosis

### 5.1 Microscopia Óptica

Luego de 90 min de co-cultivo de macrófagos con timocitos o con Acinos, las células adheridas en el vidrio fueron fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C (MERCK) durante 10, el metanol fue volcado y las células se dejaron secar para posteriormente realizar la tinción de Hematoxilina Eosina (H&E). Las monocapas de macrófagos se introdujeron en hematoxilina de Harris durante 3 minutos, luego se lavaron en abundante agua corriente hasta obtener el cambio de color, finalmente se tiñeron con eosina durante dos minutos, se lavaron y montaron en PBS:Glicerol 1:1.

Se obtuvieron fotografías de los cultivos celulares observados con un microscopio invertido Axiovert 135 (zeiss). Para el cálculo del porcentaje de fagocitosis (número de macrófagos que contienen al menos un cuerpo apoptótico ingerido) y el índice de fagocitosis o endocítico (cantidad de cuerpos apoptóticos ingeridos por 100 macrófagos) se contaron más de 300 células por muestra.

### 5.2 Microscopia Electrónica

Con el fin de obtener mayor información acerca de las características morfológicas de los macrófagos en contacto con células apoptóticas, los macrófagos provenientes de los cocultivos fueron utilizados para obtener imágenes tridimensionales de las superficies celulares mediante microscopia electrónica de barrido (Phillips 515, Holanda). Durante las observaciones se tomaron fotografías de campos representativos. Se empleó el equipo del Servicio de Microscopia Electrónica de CITEFA. Las células sembradas sobre un pequeño soporte de vidrio de 10 mm de diagonal, luego de 90 min de co-cultivo, fueron fijadas con metanol frío durante 10 min, luego las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación sumergiéndolas sucesivamente en concentraciones crecientes de acetona 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% y 100%, repitiendo tres veces cada operación. Para completar el secado de la muestra biológica se les efectuó el punto crítico (Balzers CPD 030), finalmente la muestra fue metalizada con oro (Balzers Union SCD 040), proceso que permite la interacción entre el haz de electrones del microscopio y la muestra, emitiéndose así señales que luego se traducen en pulsos eléctricos.

## 6. Microscopia Confocal

### 6.1 Translocación de p65 de NF- $\kappa$ B



Luego de cultivar los macrófagos peritoneales sobre cubreobjetos en placas de 24 wells (NUNC), con diferentes estímulos (LPS: Lipopolisacárido de *Escherichia coli* 055:B5. (L4005), Sigma Chemical Co.; LPS-VIP; VIP: NeoMPS o cocultivo con timocitos o acinos) a diferentes tiempos (basal, 15, 30, 60 y 90 min.), las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C 10 min y se marcaron con anticuerpos conjugados a fluorocromos o bien se las guardó a -20 °C hasta el momento de utilizarlas.

Para realizar la marca se bloquearon las interacciones inespecíficas utilizando BSA 1% en PBS (NaCl 137mM + KCl 2,7mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM) durante 90 min se lavaron los vidrios 3 veces con PBS-Tween, luego se incubaron los macrófagos adheridos al vidrio con una dilución 1/100 de un anticuerpo monoclonal anti p65 (anti ratón, rata, humano NFκB p65, Santa Cruz Biotechnology, INC.) del NF-κB durante 90 min en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lavaron los vidrios 3 veces con PBS-Tween y se incubaron con una dilución 1/100 de un antisuero anti-IgG conjugado a FITC (antisuero anti-IgG de conejo conjugado a FITC, BD Pharmigen.) por 30 min. Luego de lavar se tiñeron las células con una solución de yoduro de propidio (BD Pharmigen) (0.5 ug/ml) durante 5 min y se montaron los vidrios en PBS- Glicerol, previo lavado con agua bidestilada durante 5 min. Las muestras se observaron al microscopio confocal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, marca Olympus modelo FV 300 acoplado al microscopio directo (no invertido) de fluorescencia Olympus BX61.

### 6.2 Ensayo de TUNEL

Luego de cultivar los macrófagos peritoneales con los diferentes estímulos sobre cubreobjetos en placas de 24 wells a diferentes tiempos, las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C durante 10 min, el metanol fue retirado y tras secar los preparados se marcaron o se las guardo a -20 °C hasta el momento de utilizarlas.

Se utilizó el kit ApopTag FluoresceinIN situ Apoptosis Detection Kit S7110 (Chemicon International). Se realizó el protocolo según indicación del proveedor el cual consistió en: 2 lavados de 5 minutos con PBS, tratamiento con proteinasa K de 15 minutos (20ug/ml de proteinasa K en Buffer Tris pH8), luego un lavado de 5 minutos en PBS y posteriormente las muestras se incubaron 3 min en paraformaldehído 4%; nuevamente se realizaron lavados con PBS y se incubaron las muestras 5 min en Buffer de equilibrio del kit (aprox 50ul), posteriormente se incubaron durante 90 min a 37°C en la mezcla de reacción; la reacción se detuvo con buffer Stop Wash, se agitó 10 min y luego se incubó durante 10 min más a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS se incubaron las muestras 30 min con Anti-Dig Conjugate en oscuridad, se realizaron 4 lavados de 2 minutos en PBS y



se incubaron con 0,5 ug/ml de IP para posteriormente montar las muestras en PBS/glicerol y observarlas en un microscopio confocal.

### **7 Ensayos de RT-PCR**

#### **7.1 Extracción de RNA y pasaje a cDNA.**

El RNA total fue obtenido de los macrófagos peritoneales de ratones NOD y BALB/c. Todo el material descartable y soluciones empleadas para estos estudios se encontraban libres de nucleasas de RNA. Las células luego de los tratamientos fueron recuperadas mediante una solución de EDTA 2 mM fría, resuspendidas en 500 µl de Trizol (Life Technologies) y centrifugadas a 12.000 g por 10 min., el sobrenadante fue traspasado a tubos nuevos, dónde se le agregó 100 µl de cloroformo, se tapó y agitó durante 15 seg. Posteriormente se centrifugó 15 min a 12.000 g a 4 °C para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se agregó 250 µl de isopropanol (precipitación del RNA), se incubó la mezcla 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado de RNA se lavó con etanol 75%, y se resuspendió en agua DEPC.

La cantidad y pureza del RNA total obtenido se verificó por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro y el cociente de ambas lecturas se encontró en una relación entre 1,6 a 1,8. Por último las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

#### **7.2 Transcripción reversa y amplificación de fragmentos.**

Para la transcripción reversa se utilizó el Kit Ready To Go (Amersham) y el protocolo propuesto. Brevemente, 2,5 µg de RNA total fueron llevados a 33 µl de volumen final con agua DEPC e incubados a 65 °C por 5 min. Luego los tubos con la muestra y los tubos del Kit, se incubaron a 37 °C por 5 min. Posteriormente las muestras agregadas a los tubos del kit, sin mezclar e incubadas nuevamente a 37 °C por 5 min, homogenizados con vortex y centrifugadas por 10 seg. Finalmente se incubaron los tubos a 37 °C por 60 min. Para la amplificación de los receptores VPAC1 y VPAC2, se agregó 1 µl de cDNA a la siguiente mezcla de reacción ( $Mg^{2+}$  1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; Taq pol 0,625 U; Primers sense y antisense 1µM; Buffer PCR 1X), obteniendo un volumen final de 25 µl. Finalmente, las muestras fueron incubadas en un termociclador Eppendorf.

Los primers utilizados fueron los siguientes:

- **VPAC1** sense: 5'GTG AAG ACC GGC TAC ACC AT 3'; antisense: 5'TGA AGA GGG CCA TAT CCT TG 3'

- **VPAC2** sense: 5' CCA AGT CCA CAC TGC TGC TA 3'; antisense: 5' CCT CGC CAT CTT CTT TTC AG 3'

- **GAPDH** sense: 5'TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G 3', antisense: 5'TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT 3'

Que delimitan fragmentos de 178 pb para VPAC1, 198 pb para VPAC2 y 196 pb para GAPDH y los programas utilizados fueron los siguientes:

	VPAC1 / VPAC2	
Desnaturalización inicial	94 °C	10 min
Ciclos	94 °C	45 seg
	55°C	45 seg
	72 °C	90 seg
Nº de ciclos	35 ciclos	
Extensión final	72 °C	10 min

Los productos finales de amplificación fueron sembrados en buffer siembra (315 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% Glicerol, 0.5% Azul de Bromofenol, 250mM DTT) y separados en gel de agarosa (Invitrogen) 2% teñidos con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.) en buffer TBE (Tris 89 mM + Ac Bórico 89 mM + EDTA 0,5 M ph 8), corridos durante 20 min a 240 V. Luego de la corrida se expusieron los geles a luz U.V. y se fotografiaron utilizando una cámara Kodak DC120. El área de dichas bandas fue cuantificada utilizando el programa Scion Image 4.0 y se expresó en U.A. (unidades arbitrarias) y se normalizó con los niveles de GAPDH de cada muestra.

## 8. Ensayos de Western Blot.

### 8.1 Obtención de las muestras: preparación de extractos citosólicos y nucleares.

Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron recuperadas utilizando una solución 2mM de EDTA frío y centrifugadas a 3000 RPM a 4 C y posteriormente lavadas con PBS (NaCl 137mM + KCl 2,7mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM) frío. Los botones celulares

obtenidos se mezclaron con 100  $\mu$ l de buffer A, conteniendo HEPES 10mM pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, KCl 10mM, NaF 5mM, NaVO<sub>4</sub> 1mM, Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub> 10mM, DTT 1mM, NP-40 0.5% junto con inhibidores de proteasas (PMSF 17.4  $\mu$ g/ml y Leupeptina 2  $\mu$ g/ml) (Sigma Chemical Co.) y se incubaron por 15 min en hielo, tras lo cual se agitó vigorosamente por 15 s. y se centrifugó en frío a 8000 g durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70 C (extracto citosólico) y al precipitado se le realizaron dos lavados con PBS. Luego de los lavados se resuspendió el pellet con 50  $\mu$ l de buffer B conteniendo HEPES 10mM pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, KCl 10mM, NaF 5mM, NaVO<sub>4</sub> 1mM, Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub> 10mM, DTT 1mM, KCL .04M y glicerol al 20% junto con inhibidores de proteasas (PMSF 17.4  $\mu$ g/ml y Leupeptina 2  $\mu$ g/ml) (Sigma Chemical Co.), se los mezcló durante 30 min a 4 °C y se centrifugó durante 15 min. a 13.000 g, el sobrenadante (extracto nuclear) fue almacenado y congelado a -70 hasta su uso.

### **8.2 Electroforesis en geles SDS-PAGE, Transferencia, Incubación con anticuerpos y Revelado**

Cantidades iguales de proteínas (50  $\mu$ g por calle) se diluyeron en buffer de siembra (315 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% Glicerol, 0.5% Azul de Bromofenol, 250mM DTT) en una relación 4:1 en volumen, se hirvieron durante 2 min y se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS en buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1%) en un aparato de electroforesis Miniprotean III (BioRad). El porcentaje del gel y el anticuerpo empleado en cada caso fueron de 10 % para p65 (BD Pharmigen) y COX-2 (Cayman); de 12 % para I $\kappa$ B-alfa (BD pharmigen) y de 7,5% para NOS 2 (BD Pharmigen). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 120 Volts durante aproximadamente 90 min. Finalizada la electroforesis las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-P (Amersham) a una intensidad constante de 120 mA. Al cabo de 90 min se realizó una tinción de la membrana con rojo ponceau (Sigma Chemical Co) durante 5 min para verificar la eficiencia de la transferencia y se sometió a la membrana a una serie de 3 lavados con TBS-Tween (TTBS) 0.05% durante 10 min. Los marcadores de peso molecular (Bio-Rad) se corrieron y transfirieron bajo las mismas condiciones. Posteriormente se bloqueó la membrana en solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBS-Tween 0.05%) durante 3hs a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche, luego de tres lavados con TTBS las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios específicos, utilizando diluciones de 1/100 para p65 e I $\kappa$ B alfa y 1/500 para NOS 2 y COX-2, preparados en TTBS. Luego se realizaron 3 lavados con buffer TTBS, se incubaron con un anticuerpo secundario anti conejo IgG-B HRP hecho en cabra (1/1000) para p65 e I $\kappa$ B y con un anti IgG biotinilado (1/2000) (Santa Cruz Biotechnology, INC) para NOS 2 y COX-2 y se realizaron nuevamente los lavados. En algunos análisis las membranas fueron reutilizadas nuevamente con el fin

de detectar  $\beta$ -actina (Santa cruz). Las nitrocelulosas (NC) fueron incubadas en buffer stripping (2-mercaptoetanol 100 mM; SDS 2%; Tris-HCL 62,5 mM; pH 6,7) a 50 °C durante 30 min en agitación, lavadas 2 veces con TTBS y bloqueadas durante 2 horas. Se incubó con el anticuerpo durante toda la noche a 4 °C, posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:1000), lavadas y se procede al revelado.

La detección se realizó por reacción de quimioluminiscencia (ECL) (Amersham). Las bandas obtenidas se visualizaron con el Bio-Imaging Analyzer Fujifilm LAS 1000. El análisis densitométrico se realizó con el programa Scion Image 4.0 y los datos obtenidos se relativizaron a la señal obtenida en la misma membrana para  $\beta$ -actina. Para todos los casos se sembró además un marcador de peso molecular preteñido (Bio-Rad)

### **9. Marcaciones por citometría de flujo.**

Para identificar la población de macrófagos se utilizó un marcador de superficie F4/80-FITC anti ratón (eBioscience) que marca macrófagos maduros, en esa población (80% macrófagos) se analizó la producción de las citoquinas IL-10 e IL-12.

Para determinar las citoquinas IL-10 e IL12 se realizó una tinción intracitoplasmática, las células se cultivaron directamente en tubos de polipropileno con Brefeldina A (10 $\mu$ l/ml) (Sigma Chemical Co.) durante 4 horas para inhibir el transporte trans Golgi. Posteriormente se procede a despegarlas utilizando EDTA 2 mM frío, se centrifuga a 4 °C 1400 g durante 10 min y se procede a la marcación de superficie con F4/80-FITC anti ratón 1/50  $\mu$ l durante 30 min, se realiza una centrifugación durante 5 min a 625 g, se realiza la fijación utilizando 50  $\mu$ l de buffer Cytofix/cytoperm (BD Pharmigen) durante 20 min a 4 °C y se procede a la marcación intracelular incubando con buffer Perm/wash (BD pharmigen) junto con los anticuerpos para realizar la marca con PE anti raton IL-10 (eBioscience) (0.25  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células en 100ul de buffer Perm/wash) y PE-anti ratón IL-12 (eBioscience) (0.125  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células en 100ul de buffer Perm/wash) durante 30 min en oscuridad, finalmente tras dos lavados se resuspenden las células en buffer de citometría (PBS, 2% SFB: Bioser).

Para determinar la apoptosis inducida a los timocitos mediante la incubación con dexametasona como se describió en el punto 3.2, se realizó tinción con Anexina V / Ioduro de Propidio (BD Pharmigen) Entre 0.5 y 1x10<sup>6</sup> células se resuspendieron en 0.2 ml Binding Buffer 1X frío y mantuvieron en hielo. Se agregó 1  $\mu$ l de Anexina V(AV) durante 10 minutos en hielo y en oscuridad, 1 $\mu$ l de de solución de ioduro de propidio (IP) (Sigma Chemical Co.) (250  $\mu$ g/ml de ioduro de propidio). Se mezcló suavemente y analizó en citómetro de flujo inmediatamente. Se empleó un Citómetro de Flujo Facstar plus analyzer (Becton Dickinson, CA) y se adquieren 10.000 eventos. Los resultados se interpretan

utilizando el programa WinMDI® versión 2.8 y se expresan como porcentajes de células positivas usando los correspondientes controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

### **10 Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se estimó utilizando el equipo de micro-BSA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Se agregaron partes iguales de muestra (100  $\mu$ l de una dilución 1/100) y de reactivo de trabajo (100  $\mu$ l por pocillo) se incubaron 2 horas a 37 °C y se midió la absorbancia a 570 nm. Los valores obtenidos se extrapolaron a una curva estándar de BSA de concentraciones conocidas realizadas para cada uno de los experimentos.

### **11. Análisis estadísticos.**

La evaluación estadística se realizó aplicando la prueba de “t” de Student con dos colas para poblaciones independientes. Cuando comparaciones múltiples fueron necesarias, la prueba de ANOVA con contrastes de Newman-Keuls fue utilizada con el software Graph Pad Prism. Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  ES (error estándar). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con  $P < 0.05$ .

### **Resultados:**

#### ***Parte 1: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo inflamatorio***

##### ***A) Perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD***

Con el objetivo de estudiar la respuesta de los macrófagos de hembras NOD de 16 semanas frente a un estímulo inflamatorio en la etapa prediabética –y cuando ya se ha iniciado la disfunción salival-, determinamos la producción de diversos mediadores de la respuesta inflamatoria (pro y anti-inflamatorios). Del mismo modo, analizamos la respuesta de los macrófagos al VIP, como péptido anti-inflamatorio. Se emplearon macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones hembras NOD y BALB/c, usadas como control, en condiciones basales o previa incubación por 24 hs *in vitro* con LPS (lipopolisacárido bacteriano) o LPS+VIP. En todos los experimentos, el LPS se empleó conjuntamente con IFN gamma (100U/ml) dado el efecto facilitador de la citoquina en la activación en estas células.

##### ***A.1) NITRITOS***

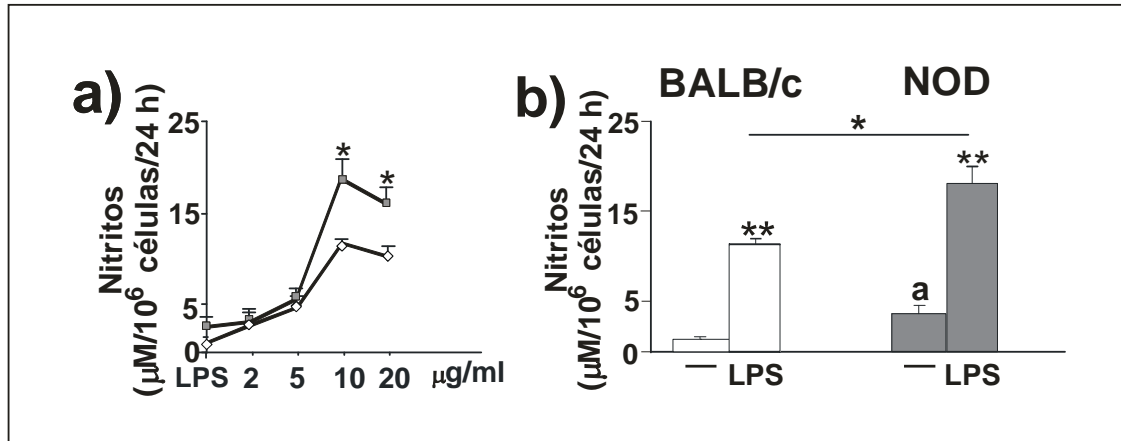
###### ***- Condiciones basales y respuesta al LPS***

Una de las primeras enzimas que se inducen en el macrófago frente a LPS es la óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la síntesis de NO (óxido nítrico) y citrulina. El NO es junto con otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno los mediadores más efectivos en la destrucción de patógenos intracelulares.

En primer lugar determinamos la producción de nitritos como mediador inflamatorio en condiciones basales y en presencia de distintas concentraciones de LPS (0, 2, 5, 10, 20 µg/ml). En la figura 1a se observa la curva concentración-respuesta de LPS en macrófagos de ambas cepas. Tanto en BALB/c como en NOD observamos un efecto máximo con 10 µg/ml de LPS, por lo que continuamos trabajando con esa concentración.

Asimismo, la figura 1a y b indican una mayor producción de nitritos por los macrófagos de la cepa

NOD tanto en condiciones basales como en respuesta al LPS comparados con la cepa control.



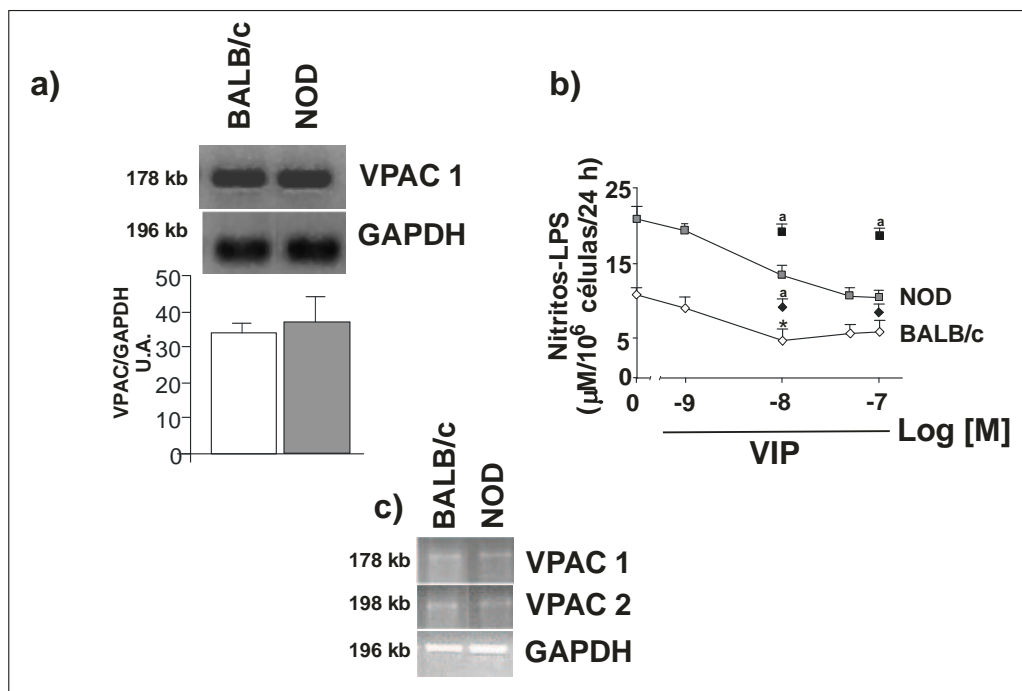
**Figura 1. Efecto de LPS en macrófagos peritoneales.** **a)** Los macrófagos peritoneales extraídos de ratones BALB/c (◇) y NOD (■) fueron incubados con diferentes concentraciones de LPS (0, 2, 5, 10, 20 μg/ml) + IFN-γ (100U/ml) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± ES de al menos 5 experimentos. \*P<0,05 vs. BALB/c a la misma concentración. **b)** Los macrófagos peritoneales extraídos de ratones BALB/c (barras blancas) y NOD (barras grises) fueron incubados con LPS (10 μg/ml) + IFN-γ (100U/ml) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± ES de al menos 10 experimentos. <sup>a</sup>P<0,05 vs. Basal BALB/c; \* P<0,05; \*\* P<0,01 vs. basal de su misma cepa.

## - Efecto de VIP

Dado que el VIP tiene efecto anti-inflamatorio y pro-Th2 sobre células inmunes, (Gomariz et. al 2000) quisimos estudiar el efecto del VIP en los macrófagos peritoneales de hembras NOD y controles BALB/c. En primer lugar verificamos la expresión del receptor VPAC1 que se expresa de manera constitutiva en macrófagos normales (Leceta J et al 2000) y cuál era su expresión en la cepa NOD. En la figura 2a, se muestra la expresión del receptor VPAC1 en macrófagos con niveles similares en ambas cepas evaluado por RT-PCR. En estas condiciones no se detectó la expresión de receptores VPAC2 en macrófagos, en ninguna de las cepas y condiciones utilizadas. En la figura 2b se muestra la curva concentración-respuesta del VIP midiendo la reducción en la producción de nitritos por macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con LPS, y evidencian que estos receptores son funcionales. Observamos que en la cepa BALB/c, 10<sup>-8</sup>M de VIP tiene la máxima eficacia para inhibir la producción de nitritos. El cálculo de la concentración inhibitoria del

## RESULTADOS

VIP ( $IC_{50} \times 10^{-9}$  M BALB/c:  $1,3 \pm 0,1$ ; NOD  $5,8 \pm 0,1$ ) indica que en los macrófagos de ratones NOD el VIP inhibe con menor potencia. Basados en estos resultados, continuamos trabajando con una concentración de VIP de  $10^{-7}$  M donde se registró la mayor inhibición de nitritos en las dos cepas. Asimismo comprobamos que el efecto inhibitorio de VIP sobre nitritos es específico ya que utilizando un inhibidor de VIP que antagoniza competitivamente la unión y el efecto del VIP en células gliales y trofoblásticas (Gozes et al 1991; Fraccaroli et al 2009) observamos que se revierte el efecto (figura 2b).

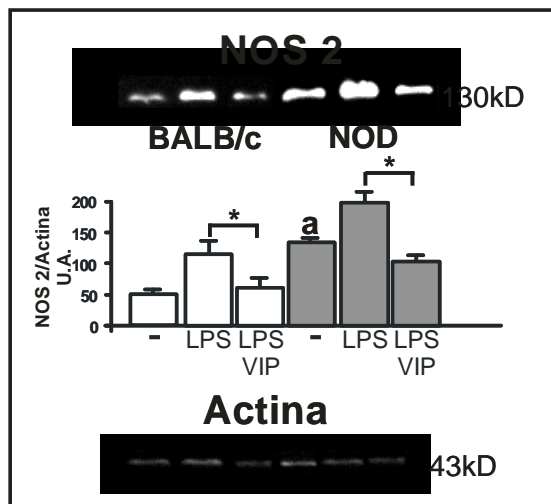


**Figura 2. Expresión de VPAC 1 y efecto inhibitorio de VIP.** (a) Los macrófagos peritoneales ( $1 \times 10^6$ /pocillo) en condiciones basales fueron recolectados para realizar la extracción de ARN y semi-cuantificación por RT-PCR de los receptores VPAC1 y VPAC2 usando los primers descritos en Materiales y Métodos. se muestra un gel representativo de otros 4 similares. Las barras representan la densitometría relativa a GAPDH y son promedios  $\pm$  ES de 3 geles (b). Los macrófagos peritoneales extraídos de ratones BALB/c (◇) y NOD (■) fueron extraídos como se indica en Materiales y Métodos ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu$ g/ml) + IFN- $\gamma$  ( $100$ U/ml) en presencia de diferentes concentraciones de VIP ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M) con o sin el antagonista de VIP ( $10^{-5}$ ) (BALB/c (◆) y NOD (■)) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 6 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. NOD a igual concentración, a indica  $P < 0,05$  vs. sin antagonista a esa concentración de VIP en correspondiente NOD y BALB/c. (c) intestino de ratón expresando ambos receptores se corrió como control positivo de expresión con los



primers empleados.

Asimismo, en la figura 3 observamos cómo se modifica la expresión de NOS 2, este resultado concuerda con el observado en la producción de nitritos con dichos estímulos (figura 1b y 2b), esto es, una mayor expresión basal en la cepa NOD, aumentó de la expresión en respuesta a LPS + IFN- $\gamma$  y una disminución de la expresión en presencia de VIP.



**Figura 3. Expresión de NOS 2 y modulación por VIP.**

Los macrófagos peritoneales ( $1 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados solos o con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) con o sin VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 24 hs. Las células adheridas se cosecharon con EDTA 2 mM frío, se extrajeron proteínas, se fraccionaron en SDS-PAGE, transfirieron y revelaron como se indica en Materiales y Métodos. se muestran geles representativos de otros 3 similares. Las barras son la media  $\pm$  ES de la intensidad de la bandas de NOS 2 relativa a actina realizada con ImageJ en al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. barras indicadas. (a)  $P < 0,05$  vs. correspondiente condición en BALB/c.

## A.2) CITOQUINAS

Una vez fijadas las concentraciones de LPS y VIP a utilizar, se realizaron experimentos para determinar la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10.

Estos mediadores se eligieron teniendo en cuenta que en los macrófagos TNF- $\alpha$  se produce durante la respuesta inflamatoria temprana y que IL-12 es una citoquina tardía que junto con IFN- $\gamma$  liberado por linfocitos T y células *natural killer* dirigen a los linfocitos Th hacia una respuesta Th1 adaptativa.

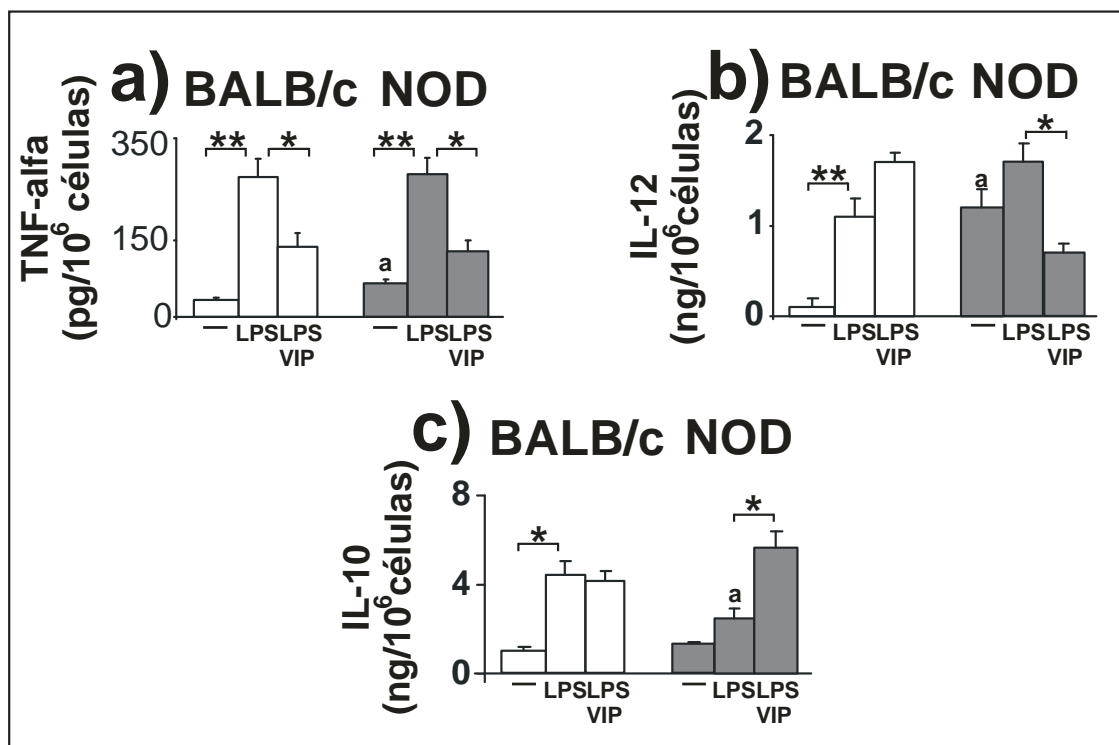
Asimismo seleccionamos IL-10 como citoquina anti-inflamatoria que modula la respuesta de los macrófagos activados por LPS.

## - Condiciones basales y respuesta al LPS.

En la figura 4a y b observamos el efecto estimulante de LPS sobre TNF- $\alpha$  e IL-12 y que los macrófagos NOD, en condiciones basales, producen mayores niveles de TNF- $\alpha$  e IL-12, comparados con la cepa control. Con respecto a IL-10 (figura 4c), la incubación con LPS no es suficiente para aumentar la producción de esta citoquina como sí puede verse en macrófagos de la cepa BALB/c.

## - Efecto de VIP.

La figura 4a, b y c muestra que frente al LPS el VIP ejerce su efecto anti-inflamatorio inhibiendo la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12. Observamos también que en los NOD VIP aumenta IL-10 hasta niveles comparables a los macrófagos BALB/c con LPS o con LPS+VIP.



**Figura 4. Mayor respuesta inflamatoria de los macrófagos NOD.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de TNF, IL-12 e IL-10 por ELISA como se describe en

## RESULTADOS

Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 5 experimentos. \*P<0,05; \*\*P<0,01 vs. barras indicadas. (a) P<0,05 vs. correspondiente condición en BALB/c.

Para estudiar si los efectos de LPS o del VIP descriptos hasta aquí variaban en los diferentes estadios del ciclo estral, realizamos los mismos ensayos en macrófagos obtenidos de las hembras NOD y BALB/c cicladas. La tabla 1 muestra las determinaciones realizadas, donde no se observan variaciones en los mediadores medidos en los diferentes estadios analizados. Se incluyen en tabla mediciones de PGE2 que se describirán más adelante.

NO <sup>-2</sup>		BALB/c				NOD			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
	Basal	1.8 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.7
	LPS	10.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	11.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	20 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	21.5 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>
	LPS+VIP	3.0 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.3	5,1 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.5

IL-12		BALB/c				NOD			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
	Basal	0.2 $\pm$ 0.1	ND	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	ND	1.2 $\pm$ 0.2
	LPS	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.2
	LPS+VIP	ND	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	ND	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>

TNF- $\alpha$		BALB/c				NOD			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
	Basal	23 $\pm$ 1.9	ND	ND	30 $\pm$ 3.7	55 $\pm$ 4.3	ND	ND	67 $\pm$ 4.9
	LPS	310 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	ND	ND	325 $\pm$ 31.1 <sup>a</sup>	333 $\pm$ 32.1 <sup>a</sup>	ND	ND	321 $\pm$ 29.2 <sup>a</sup>
	LPS+VIP	126 $\pm$ 9.9 <sup>d</sup>	ND	ND	132 $\pm$ 14.5 <sup>d</sup>	118 $\pm$ 10.4 <sup>c</sup>	ND	ND	125 $\pm$ 15.1 <sup>c</sup>

## RESULTADOS

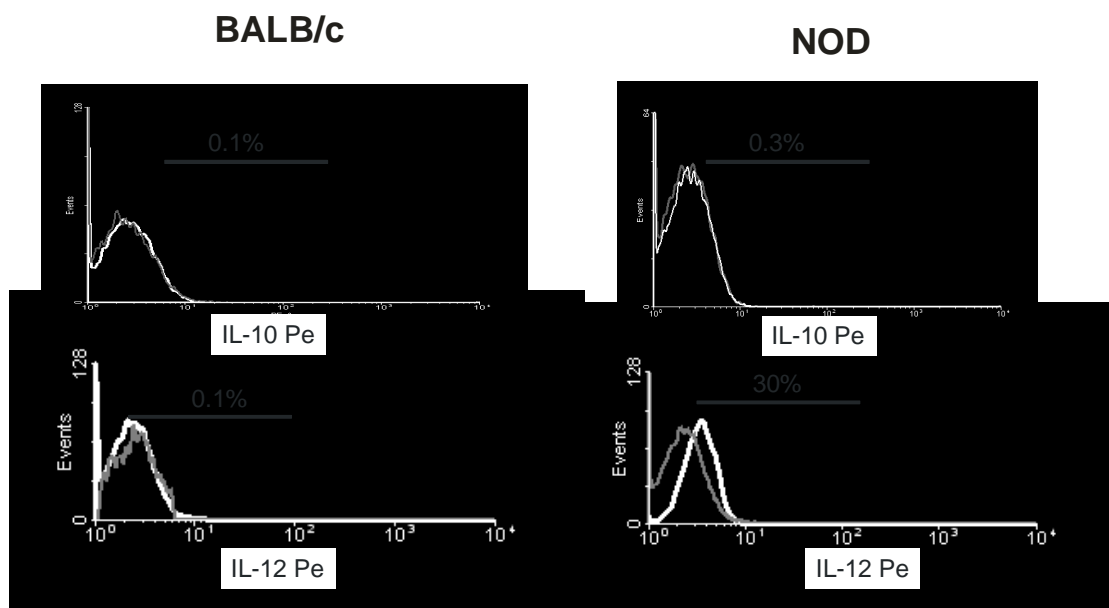
PGE2		BALB/c				NOD			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
	Basal	320±25	ND	ND	372±31	110±11	ND	ND	122±13
	LPS	530±45 <sup>b</sup>	ND	ND	510±35 <sup>b</sup>	526±33 <sup>e</sup>	ND	ND	690±52 <sup>e</sup>
	LPS+VIP	510±56	ND	ND	530±32	687±56	ND	ND	730±89

IL-10		BALB/c				NOD			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
	Basal	0.9±0.2	0.5±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	1.9±0.1	2.1±0.2	1.8±0.2	1.6±0.3
	LPS	4.1±0.5 <sup>b</sup>	3.9±0.2 <sup>b</sup>	3.7±0.1 <sup>b</sup>	4.4±0.1 <sup>b</sup>	2.3±0.2	2.0±0.1	1.9±0.3	2.4±0.6
	LPS+VIP	4.4±0.5	4.1±0.3	3.2±0.1	3.9±0.5	5.9±0.3 <sup>c</sup>	5.2±0.2 <sup>c</sup>	4.7±0.3 <sup>c</sup>	4.8±0.4 <sup>c</sup>

**Tabla 1. Determinación de mediadores en diferentes estadios del ciclo estral.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos ( $\mu\text{M}/10^6$  células) por Griess, TNF ( $\text{pg}/10^6$  células) por bioensayo, IL-12 e IL-10 ( $\text{ng}/10^6$  células) por ELISA y PGE2 ( $\text{pg}/10^6$  células) por RIA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 3 experimentos. (a)  $P < 0,05$  vs. basal BALB/c; (b)  $P < 0,01$  vs. basal BALB/c (c)  $P < 0,05$  vs. LPS NOD; (d)  $P < 0,05$  vs. LPS BALB/c; (e)  $P < 0,01$  vs basal NOD; ND: no determinado o sólo una determinación realizada.

Además, el perfil de producción de citoquinas pro y anti-inflamatoria basal de los macrófagos NOD pudimos confirmarlo mediante citometría de flujo. Para tal fin utilizamos una doble marcación con marcador de superficie específico para macrófagos maduros (F4/80) y las marcaciones intracitoplasmáticas tanto para IL-10 como para IL-12.

En la figura 5 podemos observar que los macrófagos NOD expresan niveles de citoquina IL-12-p70, la subunidad funcionalmente activa de este mediador. En estas condiciones la población F4/80 de ratones BALB/c no expresó IL-12-p70 cuando las células fueron extraídas del peritoneo en condición de reposo. No observamos expresión basal de IL-10 en células F4/80+ de ratones NOD y BALB/c.



**Figura 5. Determinación de IL-10, IL-12 intracitoplasmática en macrófagos maduros:** Los macrófagos peritoneales extraídos como se indica en materiales y métodos fueron utilizados para determinar por citometría el porcentaje de células con doble marcación de macrófagos y citoquinas como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran histogramas representativos de 3 experimentos similares realizados con poblaciones de macrófagos BALB/c y NOD.

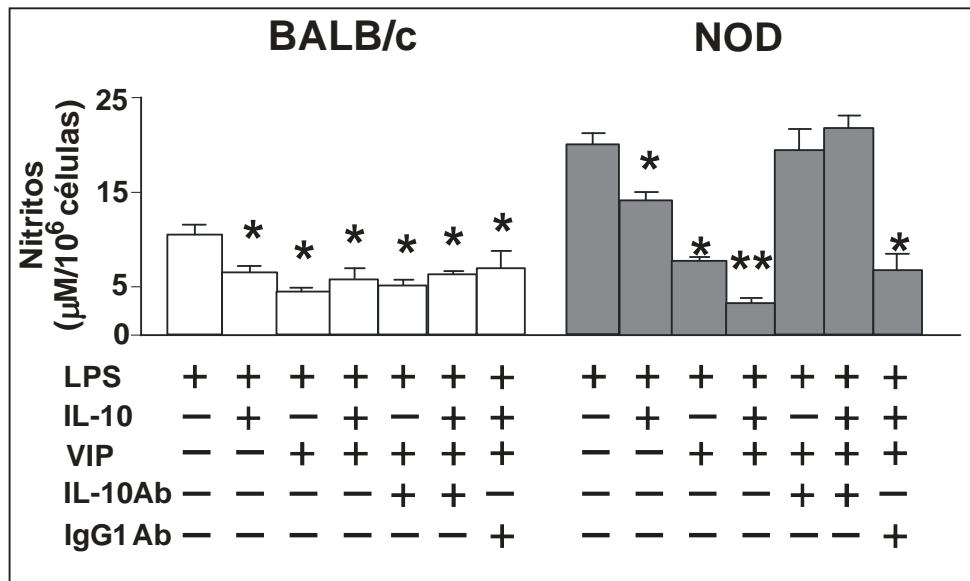
## A.3) MODULACIÓN ENTRE NITRITOS E IL-10.

Dado el aumento en los niveles de nitritos frente al LPS con una falta de producción de IL-10 en macrófagos NOD a diferencia de los BALB/c, nos preguntamos sobre la posible asociación de NO e IL-10 el efecto del VIP sobre los mismos. Hipotetizamos que la IL-10 podría inhibir la producción de nitritos y, en consecuencia, su falta de producción en los macrófagos NOD estimulados con LPS induciría mayores niveles de nitritos en los NOD. Para analizar si la presencia de IL-10 modula el efecto de LPS sobre nitritos, incubamos las células con LPS como en la figura 4 pero en presencia de concentraciones crecientes de IL-10 exógena (10, 50, 75, 100 U/ml). IL-10 fue efectiva a partir de 50U/ml en ambas cepas así que, a partir de dicha curva, empleamos en los ensayos 75U/ml, concentración con la que obtuvimos un porcentaje similar (30-40%) para reducir los nitritos estimulados con LPS en ambas cepas.

La figura 6 muestra que IL-10 exógena (75 U/ml) inhibe la producción de nitritos en ambas cepas confirmando una modulación por la citoquina. El VIP también inhibe la producción de nitritos en

## RESULTADOS

ambas cepas como se mostró en la figura 4, pero sólo se observó un efecto aditivo entre VIP e IL-10 en la cepa NOD, sugiriendo que el VIP reduce la producción de nitritos a través de IL-10 sólo en macrófagos activados de la cepa NOD donde es mayor la producción de IL-10 endógena. Vale notar que sólo en los NOD el anticuerpo bloqueante (IL-10 Ab) revirtió el efecto de VIP, consistente con la mayor producción endógena de IL-10 inducida por VIP de los macrófagos NOD.

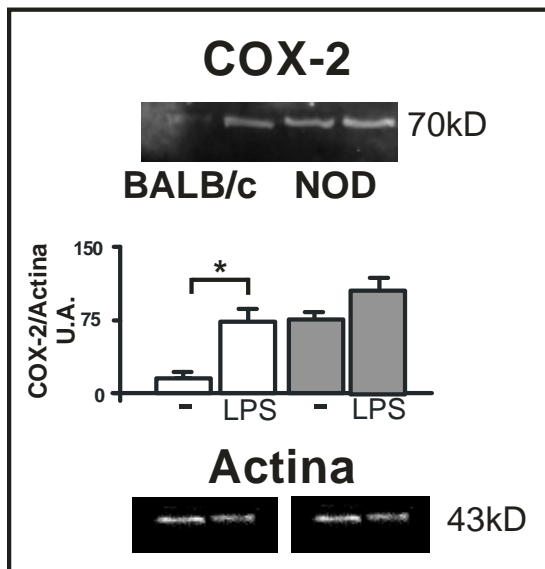


**Figura 6. Efecto de IL-10 y VIP en la producción de nitritos.** Los macrófagos peritoneales extraídos de hembras BALB/c (barras blancas) y NOD (barras grises) como se indica en materiales y métodos ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ), IL-10 ( $75\text{U/ml}$ ), anticuerpo monoclonal anti IL-10 (IL-10Ab) ( $5\mu\text{g/ml}$ ) o un anticuerpo no relacionado IgG1 (IgG1 Ab) ( $5\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 hs. Los sobrenadantes colectados fueron utilizados para determinar la producción de nitritos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. LPS+IFN- $\gamma$  dentro de cada cepa de ratón; \*\* $P < 0,01$  vs. LPS+IFN- $\gamma$ +VIP.

Teniendo en cuenta que las prostaglandinas (PGs) modulan en forma autócrina la respuesta inflamatoria en macrófagos, que PGE2 tiene efectos anti-inflamatorios e inhibitorios en macrófagos, y que la inducción de COX-2 es paralela a la de NOS 2 con el consiguiente aumento de nitritos y PGs en diversos modelos de inflamación, analizamos la potencial participación de PGE2 en el efecto de VIP.

## RESULTADOS

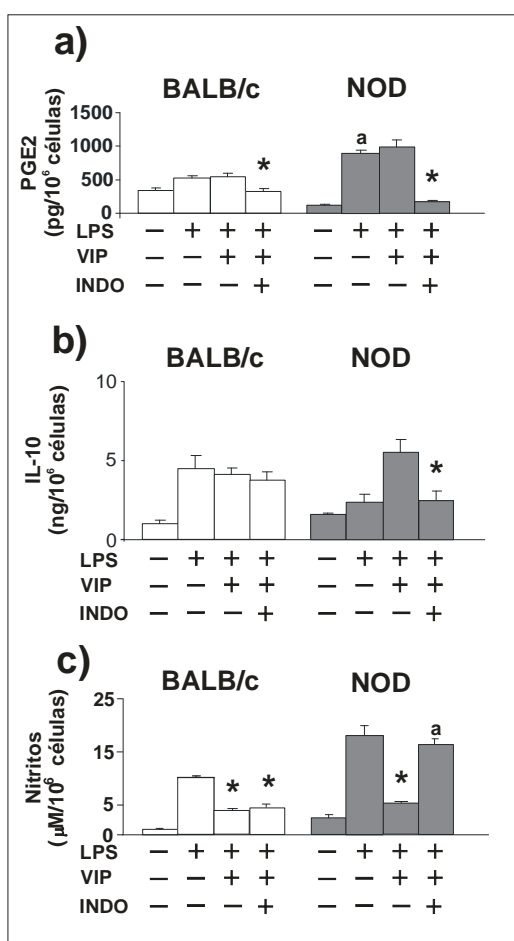
En primer lugar analizamos los niveles de expresión de COX-2 en condiciones basales y en presencia de LPS + IFN  $\gamma$ . En las figuras 7 y 8a se observa la inducción de COX-2 y el aumento de PGE<sub>2</sub>.



**Figura 7. Expresión de COX-2.** Los macrófagos peritoneales extraídos como se indica en Materiales y Métodos ( $1 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados solos o con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) durante 24 hs. Las células se cosecharon y tras la extracción de proteínas, se fraccionaron en SDS-PAGE, transfirieron y revelaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. Barras indicadas.

En la figura 8a observamos que LPS no sólo produce un aumento de IL-10 sino que también aumenta la producción de PGE<sub>2</sub> en ambos casos, con un efecto significativamente mayor en los macrófagos NOD que en los controles. VIP aumenta IL-10 pero no modula PGE<sub>2</sub> (figura 8a)

A su vez, la figura 8 b y c muestran el efecto de PGE<sub>2</sub> endógena sobre la producción de nitritos y de IL-10. Se observa que la indometacina (INDO) ( $10^{-6}\text{M}$ ) (inhibidor no selectivo de COX, figura 8a) previene el efecto de VIP tanto en la producción de IL-10 (figura 8b) como en el efecto de VIP sobre los nitritos (figura 8c).



**Figura 8. Efecto de los productos de COX sobre VIP.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U/ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) o indometacina ( $10^{-6}\text{M}$ ) (INDO) durante 24 hs. Los sobrenadantes colectados fueron utilizados para determinar la producción de nitritos, IL-10 y PGE2 como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. En (a, c) \* $P < 0,05$  vs. LPS+IFN- $\gamma$  dentro de cada cepa de ratón. En (b): \* $P < 0,05$  vs. LPS+IFN- $\gamma$  + VIP. En (a,c) <sup>a</sup> significa  $P < 0,05$  vs. correspondiente en BALB/c.

Dado que VIP actúa disminuyendo nitritos en NOD a través de la producción de IL-10 y PGE2 quisimos comprobar si la PGE<sub>2</sub> exógena modulaba nitritos e IL-10.

La tabla 2a nos muestra que PGE2 agregada exógenamente, efectivamente, disminuye la producción de nitritos inducidos por LPS en ambas cepas, haciéndose más evidente en NOD, y aumenta IL-10 sólo en los macrófagos peritoneales de la cepa NOD.



## RESULTADOS

	NITRITOS ( $\mu\text{M}/10^6$ células)		IL-10 ( $\text{ng}/10^6$ células)	
	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD
<b>LPS+IFN-<math>\gamma</math></b>	11.0 $\pm$ 0.6	20.0 $\pm$ 1.2	4.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.6
<b>LPS+IFN<math>\gamma</math>+PGE2</b>	7.7 $\pm$ 0.8*	12.0 $\pm$ 0.2**	4.5 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.3**

**Tabla 2a. Efecto de PGE2 sobre macrófagos activados con LPS.** Los macrófagos peritoneales extraídos como se indica en materiales y métodos fueron incubados con LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (5x10<sup>-8</sup>M) durante 24 hs. Los sobrenadantes colectados fueron utilizados para determinar la producción de nitritos e IL-10 como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \*P<0.05 y \*\*P<0.01 vs LPS+IFN- $\gamma$  dentro de cada cepa de ratón.

	NITRITOS ( $\mu\text{M}/10^6$ cel)		IL-10 ( $\text{ng}/10^6$ cel)		PGE2 ( $\text{pg}/10^6$ cel)	
	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD
<b>BASAL</b>	1.2 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.2	372 $\pm$ 31	122 $\pm$ 13
<b>VIP</b>	1.1 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.3**	530 $\pm$ 32*	320 $\pm$ 28**

**Tabla 2b. Efecto de VIP sobre macrófagos.** Los macrófagos peritoneales extraídos como se indica en materiales y métodos fueron incubados con VIP (10x10<sup>-7</sup>M) durante 24 hs. Los sobrenadantes colectados fueron utilizados para determinar la producción de nitritos, PGE2 e IL-10 como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \*P<0.05 y \*\*P<0.01 vs basal en cada cepa.

Finalmente VIP por sí solo no aumento la producción de nitritos pero si de IL-10 y PGE2 en NOD (tabla 2b).

### ***Conclusiones parciales parte 1 A: Perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD***

Los resultados presentados hasta aquí indican que los macrófagos extraídos en condiciones de reposo de la cavidad peritoneal de hembras NOD prediabéticas de 16 semanas ya se encuentran activados y producen, en respuesta a un estímulo inflamatorio *in vitro* como el LPS, mayores niveles de mediadores pro-inflamatorios y menor cantidad de IL-10. Estos macrófagos presentan un perfil de activación que sugiere una menor eficacia para regular la producción de nitritos frente a un estímulo inflamatorio, comparados con los macrófagos de una cepa normal (BALB/c). Por su parte, en macrófagos NOD el VIP modula la respuesta inflamatoria actuando a través de la producción de IL-10 y metabolitos de COX, como por ejemplo la PGE2, que limitan la producción de nitritos.

### ***B) Señales intracelulares involucradas en los efectos observados.***

Basados en los resultados acerca del perfil diferencial en la producción de mediadores proinflamatorios por parte de los macrófagos NOD, decidimos estudiar posibles diferencias en las vías de señalización intracelular inducidas por el LPS.

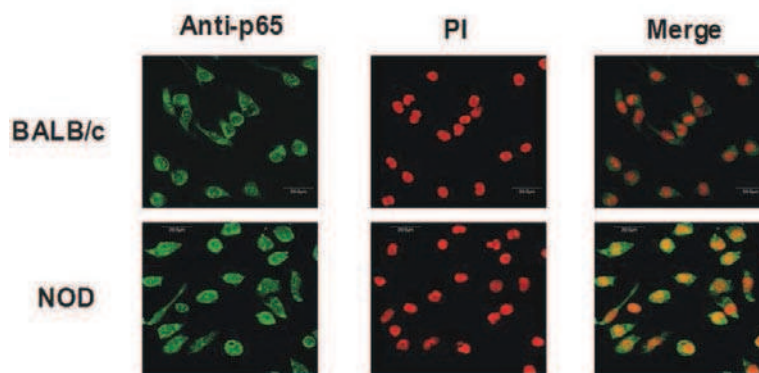
#### ***B.1) Participación de NF- $\kappa$ B. Activación y translocación de p65.***

Como una señal de activación de esta vía estudiamos, en primer término, la translocación desde el citoplasma al núcleo de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B por microscopía confocal. Para ello estimulamos a los macrófagos en diferentes tiempos (0, 15, 30 y 60 min) con LPS y en presencia o ausencia de VIP.

##### ***- Condiciones basales y respuesta al LPS:***

La figura 9 muestra la localización citoplasmática de p65 (anti-p65) en macrófagos BALB/c (panel superior), la tinción nuclear con ioduro de propidio (PI) y *Merge* representa la superposición de ambas imágenes en ausencia de estímulo.

En el panel inferior se muestra la translocación de p65 al núcleo en condiciones basales sin estímulo inflamatorio, en macrófagos de la cepa NOD que no se observa en la cepa BALB/c. Este resultado es consistente con los niveles aumentados de mediadores proinflamatorios que se inducen vía Nf- $\kappa$ B en condiciones basales descritos antes, con la mayor expresión de marcadores de activación en estas células y con un estado de activación en condiciones de reposo.

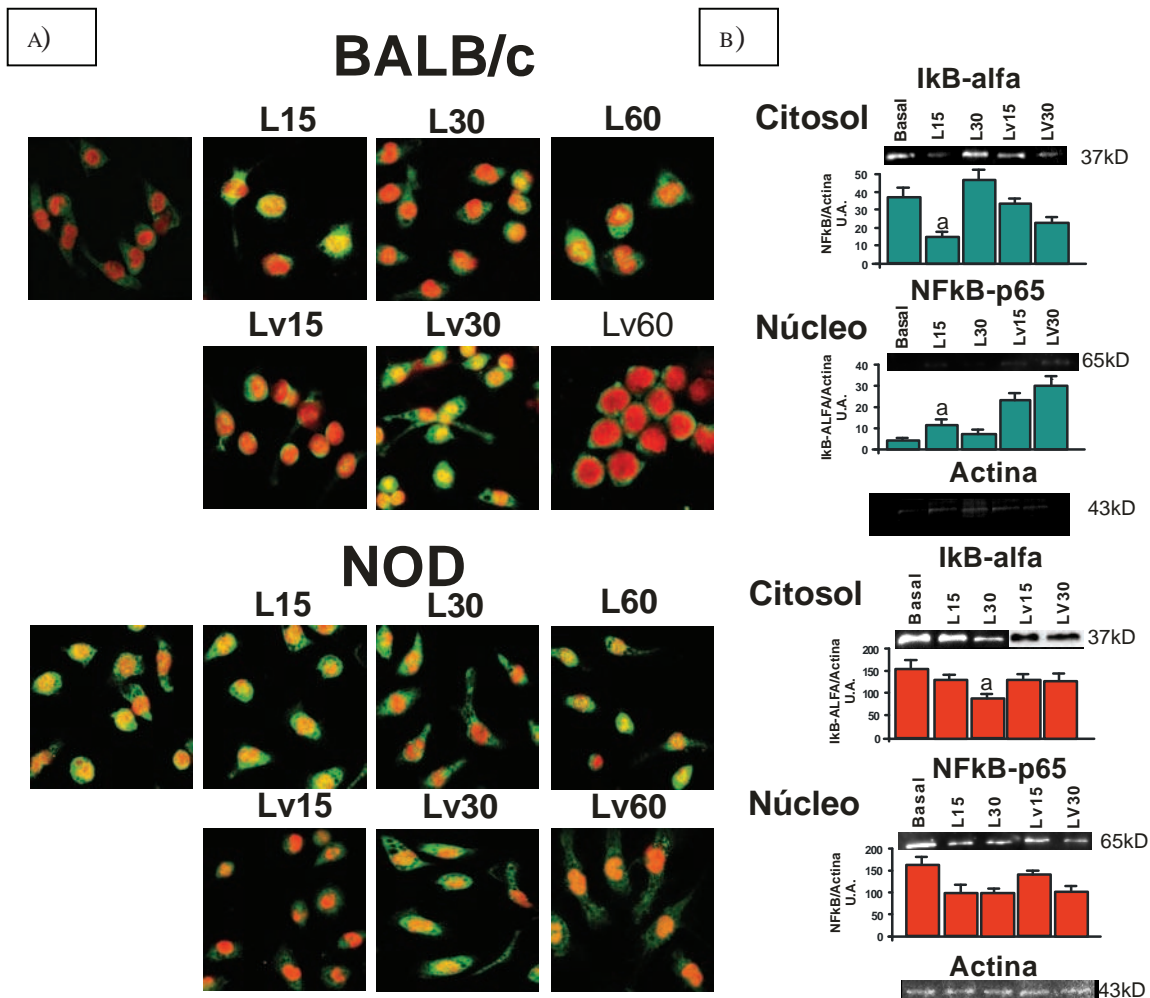


**Figura 9: Expresión de p65 en macrófagos peritoneales en condiciones basales.** Macrófagos peritoneales extraídos de la cavidad peritoneal se fijaron con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF- $\kappa\text{B}$  como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 5 experimentos similares con muestras de distintos ratones NOD y BALB/c; PI: Ioduro de propidio; Merge: superposición.

Cuando estimulamos a los macrófagos con LPS observamos que en los ratones controles la translocación del factor nuclear inducida por este estímulo se produce a los 15 min (Figura 10). En contraste, en los macrófagos NOD, la translocación de la subunidad p65 al núcleo no parece variar con los diferentes tiempos de inducción con LPS.

### **- Efecto de VIP:**

En la figura 10a observamos que tanto en los ratones BALB/c como en los NOD el VIP inhibe la translocación de p65.



**Figura 10. Translocación de p65 en macrófagos peritoneales inducidos con LPS en ausencia y presencia de VIP.** a) Macrófagos peritoneales fueron tratados con LPS (10  $\mu$ g/ml) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) y con o sin VIP (10<sup>-7</sup>M) durante 15, 30 y 60 min. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a -20°C y se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 4 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD.

**b) Western blot de fracciones nucleares (p65) y citosólicas (ikB alfa):** Los macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratones fueron estimulados a diferentes tiempos con LPS (10  $\mu$ g/ml) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) como en a) en ausencia y presencia de VIP (10<sup>-7</sup>M). Se recolectaron las células adheridas en la placa de cultivo y se fraccionaron los extractos nucleares y citosólicos en SDS-PAGE, las proteínas transfirieron y revelaron como se indica en Materiales y Métodos. (a) P<0.05 vs. basal. L: LPS; LV: LPS+VIP

La figura 10b permite confirmar mediante western blot, el patrón observado por microscopia confocal extrayendo las fracciones citoplasmáticas y nucleares posteriormente a la incubación de las células con LPS o VIP. Nuevamente observamos la presencia de mayores niveles de proteína p65 en la fracción nuclear de macrófagos NOD en condiciones basales sin estímulo de LPS (figura 10b inferior derecha). A su vez, sólo en la cepa control se puede seguir en el tiempo a través del gráfico la desaparición a los 15 min de I $\kappa$ B-alfa de la fracción citoplasmática y su reaparición a los 30 minutos. En la cepa NOD en cambio por western blot no se observó un patrón cinético de translocación de p65 al núcleo, y en cuanto a la degradación de I $\kappa$ B inducida por LPS ocurre más tardíamente (30min) y su reaparición no se observa aún a los 60 min (datos no mostrados). Así también en la cepa NOD, el efecto de VIP aparece menos claro especialmente en la translocación de p65.

### ***B.2) Vías de transducción involucradas en el efecto de VIP.***

Es conocido que VIP, a través de receptores presentes en células inmunes, ejerce su acción anti-inflamatoria principalmente por una ruta dependiente de AMPc-PKA y otra independiente. En el caso de los macrófagos, VIP promueve el incremento de citoquinas antiinflamatorias a través de la ruta dependiente de AMPc promoviendo, por ejemplo, la unión del factor CREB en el ADN y así aumenta la transcripción de IL-10 y reduce la transcripción de genes proinflamatorios.

Por lo tanto, además de estudiar la translocación de NF- $\kappa$ B por microscopia confocal y WB, quisimos investigar el efecto de VIP sobre los mediadores inducidos en estas vías utilizando diferentes inhibidores.

#### **- Inhibición de la vía de p65**

Para tal fin incubamos los cultivos de macrófagos peritoneales con sulfasalazina (500 $\mu$ M) que actúa inhibiendo a la quinasa responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B quedando el factor NF- $\kappa$ B localizado en el citoplasma.

En la Tabla 3 vemos que en los macrófagos BALB/c sulfasalazina produce una disminución de nitritos tanto en condiciones basales como con LPS pero, como era esperable, no interfiere con las

## RESULTADOS

vías por las cuales VIP inhibe a p65. En macrófagos NOD observamos un comportamiento similar. En cuanto a la producción de IL-10 inducida por LPS, vemos que la cepa NOD no necesita de la activación de p65, es decir de los mediadores pro-inflamatorios, para la producción de IL-10, sino que había algún mecanismo alternativo para su producción. En la cepa BALB/c la activación de la translocación de p65 con LPS está asociada a la producción de mediadores anti-inflamatorios, como en este caso IL-10.

	NITRITOS ( $\mu\text{M}/10^6$ células)				IL-10 (ng/ $10^6$ células)			
	BALB/c		NOD		BALB/c		NOD	
	(-)	sulfasalazina	(-)	sulfasalazina	(-)	sulfasalazina	(-)	sulfasalazina
Basal	2.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1*	4.9 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.2*	0.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2
LPS	11.1 $\pm$ 2.1	4.1 $\pm$ 0.6**	20.9 $\pm$ 2.1	3.9 $\pm$ 0.3**	4.1 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3*	2.3 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.3
LPS-VIP	3.4 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.1*	4.8 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.4

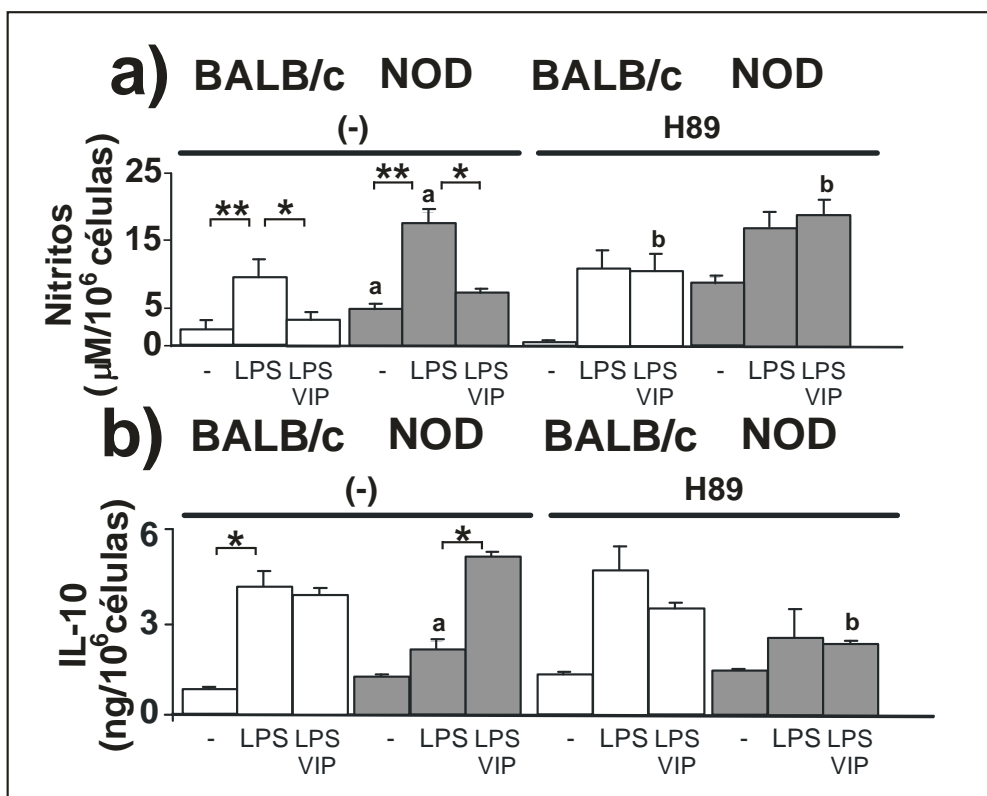
**Tabla 3. Producción de nitritos e IL-10 en presencia y ausencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U}/\text{ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) y sulfasalazina ( $500 \mu\text{M}$ ) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess e IL-10 por ELISA. \* $P < 0,05$  vs. correspondiente condición en (-) sin sulfasalazina; \*\* $P < 0,01$  vs. correspondiente condición en (-) sin sulfasalazina. Los valores son  $\bar{X} \pm \text{ES}$  de al menos 3 experimentos

La participación del proteasoma en la producción de nitritos basal e inducida por LPS fue confirmada en ambas cepas con el inhibidor MG 132 ( $20 \mu\text{M}$ ):  $\bar{X} \pm \text{ES}$ , BALB/c basal con MG  $0.4 \pm 0.1^*$ ; LPS con MG:  $2.3 \pm 0.3^*$  ( $n=3$ ); NOD basal con MG:  $1.3 \pm 0.1^*$ , LPS con MG:  $7.4 \pm 0.2^*$  ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$  vs. correspondiente condición expresada en la tabla 3.

## - Inhibición de la vía de AMPc/PKA:

Dado que VIP ejerce muchos de sus efectos a través de una vía dependiente de AMPc/PKA utilizamos el inhibidor H89 (0.1µM) en los efectos descriptos.

La figura 11 muestra que, en macrófagos NOD, VIP señala vía PKA en cuanto a la inhibición de la producción de nitritos. Asimismo observamos que requiere de la vía AMPc/PKA para producir IL-10. Estos resultados, a su vez, son consistentes con el efecto de IL-10 sobre la producción de nitritos en presencia de VIP comentados en la primera sección.



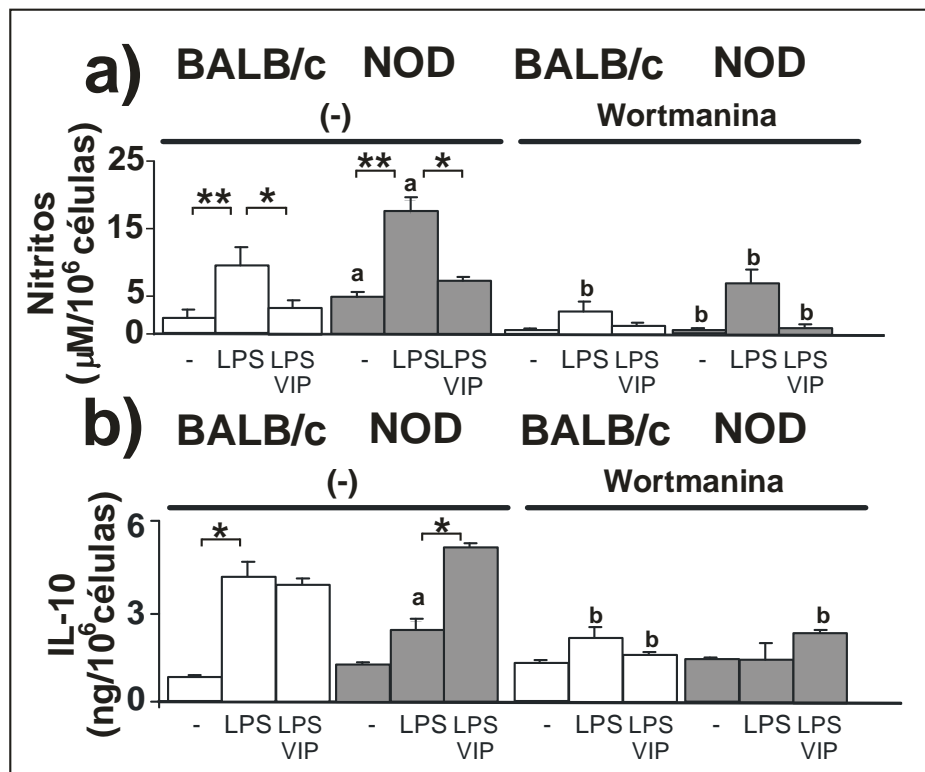
**Figura 11. Efecto de VIP sobre la producción de nitritos e IL-10: dependencia de la vía AMPc/PKA.** Los macrófagos peritoneales extraídos como se indica en materiales y métodos ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS (10 µg/ml) + IFN-γ (100U/ml) en presencia de ausencia de VIP ( $10^{-7}$ M) y H89 (0.1µM) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess a) e IL-10 b) por ELISA. Los valores son  $\bar{X} \pm ES$  de al menos 3 experimentos (a)  $P < 0,05$  vs. igual condición BALB/c; (b)  $P < 0,05$  vs. LPS-VIP sin inhibidor en correspondiente cepa. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  vs. barras indicadas.



## - Inhibición de la vía de PI3K:

Es sabido que PI3K se halla desregulada durante procesos tumorales. Hay indicios que indican que PI3K también participaría en la inducción de procesos inflamatorios crónicos, por este motivo estudiamos esta vía en nuestro modelo, para lo cual utilizamos wortmanina (200nM) como un inhibidor específico.

En la figura 12 observamos que wortmanina en los macrófagos de ambas cepas disminuye la intensidad de todas las señales sin modificar los perfiles.



**Figura 12. Producción de nitritos e IL-10: dependencia de la vía PI3K.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron incubados con LPS ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) + IFN- $\gamma$  ( $100\text{U}/\text{ml}$ ) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) y wortmanina ( $200\text{nM}$ ) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess a) e IL-10 b) por ELISA. Los valores son  $\bar{X} \pm \text{ES}$  ( $n=3$ ). (a)  $P < 0,05$  vs. igual condición BALB/c; (b)  $P < 0,05$  vs. LPS-VIP sin inhibidor en correspondiente cepa. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  vs. barras indicadas.

### ***Conclusiones parciales parte 1 B: señales intracelulares involucradas en los efectos observados***

Los resultados indican que los macrófagos peritoneales de ratones NOD prediabéticos presentan una translocación basal de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B confirmando las observaciones previas acerca del aumento de mediadores en condiciones basales. En cambio los ratones controles BALB/c requieren de un estímulo inflamatorio como el LPS para que la subunidad p65 se transloque al núcleo y se activen las vías pro-inflamatorias. En cuanto al efecto de VIP, en los macrófagos de ambas cepas observamos que inhibe la translocación del factor NF- $\kappa$ B siendo el efecto más claro en cuanto a la eficacia y cinética en los macrófagos controles.

En presencia de dos inhibidores de NF- $\kappa$ B que actúan a diferentes niveles, uno inhibiendo a la quinasa responsable de la degradación del complejo que mantiene unido a p65 en el citoplasma, y otro que inhibe a nivel del proteasoma, observamos que en los macrófagos NOD se produce disminución de la producción de nitritos tanto en condiciones basales como frente a LPS sin interferir en la respuesta al VIP. De igual forma, los macrófagos NOD no requieren de la vía de p65 para la producción de IL-10.

Por último, debemos resaltar que en los macrófagos NOD VIP utiliza la vía AMPc/PKA para producir IL-10 e interferir en la producción de nitritos.

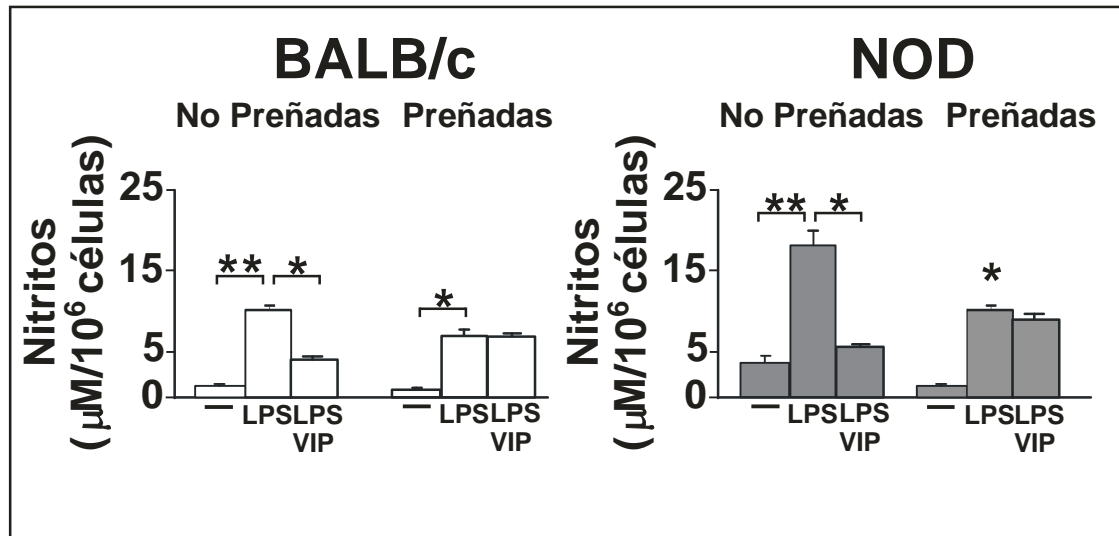
### ***Parte 2: Efecto de la preñez sobre el perfil de activación de los macrófagos.***

#### ***A) Perfil de activación en condiciones basales y frente a LPS.***

Durante la preñez la respuesta de las células T se halla polarizada hacia una respuesta dominante del tipo Th2 y tolerogénica que produce citoquinas que modulan muchas de las funciones de los macrófagos. A su vez, los macrófagos participan en múltiples procesos para el mantenimiento de la homeostasis tisular y vigilancia inmunológica en las etapas tempranas de la gestación. Dado que la cepa NOD, a las 16 semanas durante el estadio prediabético, presenta una respuesta Th1 espontánea (Roca et al 2006), nos interesó investigar el estado de activación de los macrófagos peritoneales de estos ratones durante la preñez. Para tal propósito se utilizaron macrófagos de hembras NOD y BALB/c de 16 semanas sacrificadas en el día 9 de su primera gestación.

En la figura 13 observamos que los macrófagos NOD durante la preñez ya no presentan una producción basal aumentada de nitritos comparada con la cepa BALB/c, además observamos que LPS induce un efecto menor en ambas cepas y que el VIP no modifica estos efectos.

Asimismo en la tabla 4 observamos que la preñez disminuye la producción de IL-12 en condiciones basales y que en presencia de LPS aumenta la producción de IL-10 como en la cepa control, no necesitando el estímulo de VIP para producir esta citoquina como sucedía en hembras no preñadas.



**Figura 13. Producción de nitritos en macrófagos de hembras preñadas:** Los macrófagos peritoneales fueron extraídos de ratones BALB/c (barras blancas) y NOD (barras grises) de 16 semanas en el día 9 de gestación y fueron incubados con LPS (10 µg/ml) + IFN-γ (100U/ml) en ausencia o presencia de VIP (10<sup>-7</sup> M) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± ES de al menos 4 experimentos. \* P<0,05 \*\* P<0,01.

IL-10	No Preñadas		Preñadas	
	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD
Basal	0.9 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>
LPS	4.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.4 ± 0,6	4,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
LPS-VIP	5.4 ± 0,8	5.9 ± 0,3	5.4 ± 0,5	5.4 ± 0,3

IL-12	No Preñadas		Preñadas	
	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD
Basal	0,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0.1 <sup>c</sup>
LPS	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
LPS-VIP	1,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,2

**Tabla 4. Producción de citoquinas por macrófagos peritoneales de hembras preñadas.** Los macrófagos peritoneales (0.5 x 10<sup>6</sup>/pocillo) fueron incubados con LPS (10 µg/ml) + IFN-γ (100U/ml) en presencia o ausencia de VIP (10<sup>-7</sup>M) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de IL-12 e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± ES de al menos 3 experimentos. La concentración de ambas citoquinas se expresa en ng/ 10<sup>6</sup> células (a) P<0,05 vs. Basal correspondiente; (b) P<0,05 vs. LPS, (c) P<0,05 vs. No preñadas de la misma cepa.

## B) Señales intracelulares durante la preñez

Dado que la producción de nitritos se halla normalizada en los macrófagos peritoneales de la cepa NOD durante la preñez temprana, quisimos investigar la activación de NF- $\kappa$ B durante esta condición, para lo cual se realizaron cultivos de macrófagos peritoneales obtenidos de hembras preñadas en el día 9 y se realizó microscopia confocal para observar la translocación de p65. La figura 14 muestra que, a diferencia de las hembras no preñadas, en las NOD en día 9 de gestación no se observa translocación basal de p65. El LPS indujo translocación de p65 en ambas cepas. En cuanto al efecto de VIP sobre la translocación de p65 inducida por LPS, durante la preñez observamos un comportamiento similar al observado en hembras vírgenes en cuanto a la cinética. La figura 14b los resultados de I $\kappa$ B western blot son consistentes con el patrón observado por microscopia confocal.

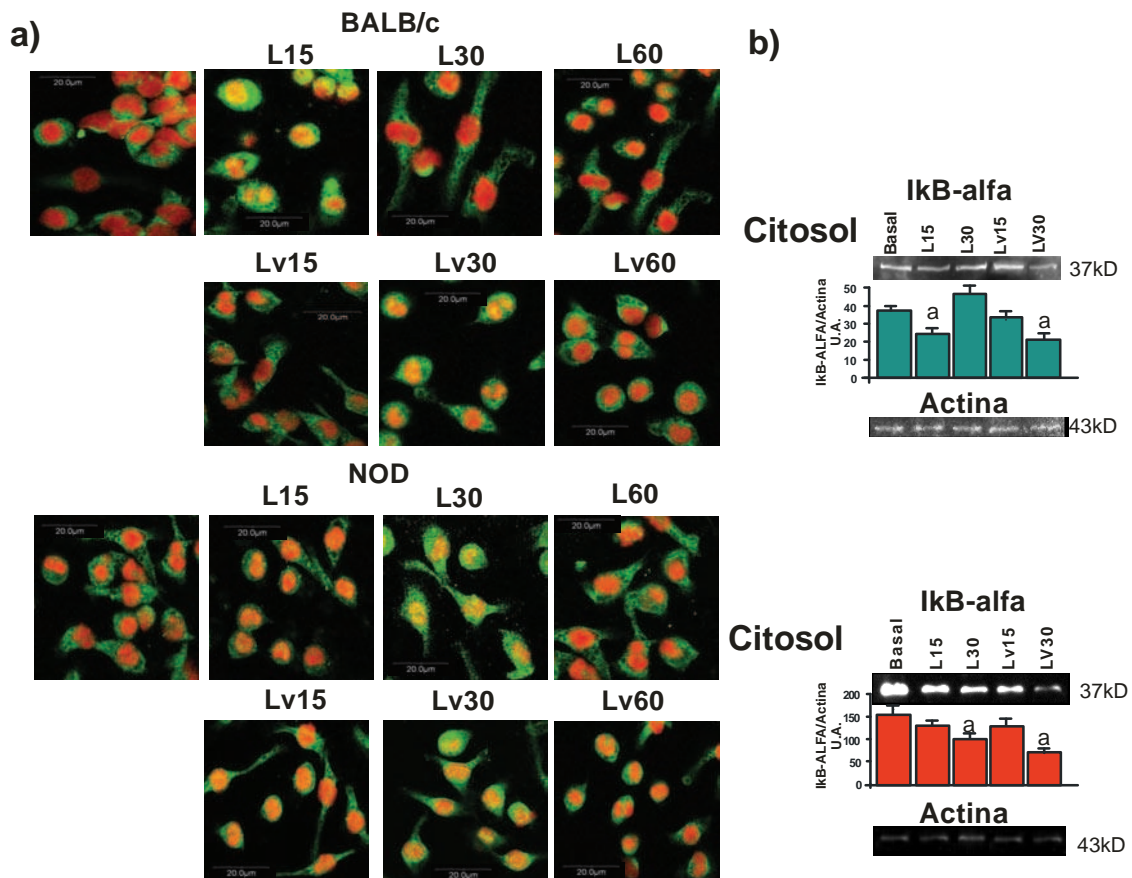


Figura 14. Translocación de p65 en macrófagos peritoneales de hembras preñadas inducidos con LPS en ausencia y presencia de VIP.

**a)** Macrófagos peritoneales fueron tratados con LPS (10 µg/ml) + IFN-γ (100U/ml) y VIP (10<sup>-7</sup>M) durante 15, 30 y 60 min. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a -20°C y se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF-kB como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 4 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD.

**b) Western blot de fracciones citosólicas (IκB α).** Los macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratones fueron estimulados a diferentes tiempos con LPS (10 µg/ml) e IFN-gamma en ausencia y presencia de VIP (10<sup>-7</sup>M). Se recolectaron las células adheridas en la placa de cultivo y se realizó la extracción de las fracciones nucleares y citosólicas, se fraccionaron las proteínas en SDS-PAGE, transfirieron y revelaron como se indica en Materiales y Métodos. a P<0.05 vs condición basal en cada cepa.

## C- Efecto de la progesterona en macrófagos peritoneales de hembras NOD no preñadas

Dado el efecto inmunomodulador de la progesterona (P) durante la gestación y los resultados obtenidos en macrófagos de hembras preñadas, quisimos investigar el perfil de activación de los macrófagos en presencia de la hormona. Por este motivo a los macrófagos peritoneales extraídos de hembras vírgenes se los cultivó en presencia de progesterona (5ug/ml) y se comparó la respuesta con los macrófagos de hembras preñadas.

La tabla 5 muestra que la progesterona sola no es suficiente para modular la activación de los macrófagos peritoneales como lo que se observa durante la preñez, incluso disminuye los niveles de IL-10 en todas las condiciones.

	NOD			NOD + Progesterona			NOD preñado Día 9		
	IL-10	Nitritos	IL-12	IL-10	Nitritos	IL-12	IL-10	Nitritos	IL-12
<b>Basal</b>	1.6±0.3	4.3±0.3	1.2±0.2	0.3±0.1 <sup>A</sup>	1.0±0.1 <sup>A</sup>	0.1±0.1 <sup>A</sup>	0.5±0.1	0.5±0.1	0.1±0.1
<b>LPS</b>	2.4±0.6	20.0±1.2	1.7±0.5	0.7±0.1 <sup>A</sup>	3.0±0.3 <sup>A</sup>	0.1±0.1 <sup>A</sup>	5.5±0.6 <sup>B</sup>	6.0±0.3 <sup>A</sup>	3.3±0.6 <sup>A</sup>
<b>LPS+VIP</b>	5.9±0.3	3.8±0.2	0.7±0.1	0.8±0.1 <sup>A</sup>	4.0±0.4	1.0±0.3	5.4±0.3	5.6±0.1	1.2±0.2

**Tabla 5. Mediadores en presencia de progesterona durante la preñez:** Los macrófagos peritoneales (0.5 x 10<sup>6</sup>/pocillo) de hembras NOD vírgenes (NOD) o preñadas (NOD preñadas día 9) fueron incubados con LPS (10 µg/ml) + IFN-γ (100U/ml) en presencia o ausencia de VIP (10<sup>-7</sup>M) y de Progesterona (5ug/ml) durante 24 hs. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess (expresados en µM/10<sup>6</sup> células) y citoquinas por ELISA (expresadas en ng/10<sup>6</sup> células) como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± ES de al menos 4 experimentos. (a) P<0.05 vs. Idéntica condición en NOD vírgenes, (b) P<0.05 vs. IL-10 con LPS en vírgenes y vírgenes + progesterona,

### ***Conclusiones Parte 2: Efecto de la preñez sobre el perfil de activación de los macrófagos***

Los macrófagos de hembras NOD preñadas normalizan su perfil presentando un comportamiento similar a las hembras controles en cuanto a la producción de nitritos e IL-10 en condiciones basales y con LPS. De igual manera observamos que se normalizan los niveles basales de IL-12. Por otra parte, cabe destacar con respecto a la translocación del factor NF-kB que no se observa translocación a nivel basal como se veía en los macrófagos NOD de hembras vírgenes. También observamos que no responden al VIP disminuyendo la producción de nitritos. Asimismo la progesterona agregada *in vitro* no es suficiente para simular el perfil observado en el día 9 de gestación.

### ***Parte 3: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo fagocítico.***

Se han publicado trabajos que indican que la iniciación de la autoinmunidad en la cepa NOD podría estar relacionada con una eliminación deficiente de células beta pancreáticas apoptóticas por parte de los macrófagos NOD (O'Brien BA et al 2002). Teniendo en cuenta este antecedente decidimos estudiar la función fagocítica de los macrófagos NOD de 16 semanas tanto por microscopía de contraste de fase, electrónica y confocal. Dado que la fagocitosis normal de células apoptóticas es un proceso silencioso que no induce mediadores inflamatorios nos interesó ver que mediadores producían los macrófagos BALB/c y NOD cuando se los cocultivaba con las células apoptóticas. Empleamos en primer lugar timocitos apoptóticos como modelo estandarizado de células apoptóticas.

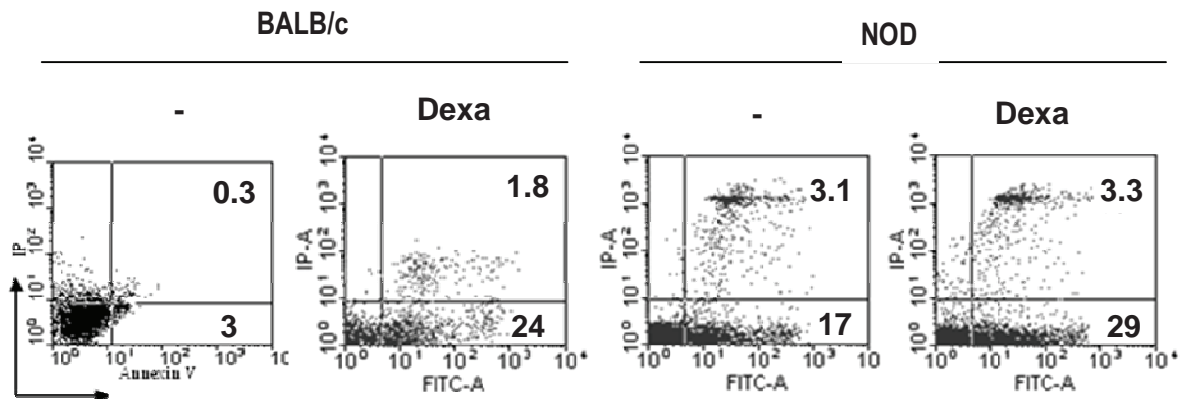
#### ***A) Perfil de activación***

##### ***A.1) Inducción de la apoptosis en timocitos***

Con el objetivo de estudiar la respuesta de macrófagos de ratones NOD y BALB/c frente a un estímulo apoptótico, se aislaron timocitos de machos de 21 días de edad (tanto NOD como BALB/c) y se los incubó con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ) durante 4 horas para inducirles apoptosis. Luego de la inducción se realizaron cocultivos de macrófagos y timocitos durante 90 min y se evaluó el perfil de activación de los macrófagos.

En la figura 15 observamos los resultados obtenidos por citometría de flujo de los timocitos teñidos con ioduro de propidio y anexina V y vemos en todos los casos predominio de una población anexina V positivas con un mínimo porcentaje de células IP-anexina V positivas en todas las condiciones. La cepa NOD presenta un ligero aumento de apoptosis basal.





**Figura 15. Poblaciones de timocitos e Inducción de apoptosis:** Los timocitos extraídos de ratones machos de 3 semanas de edad fueron incubados con Dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ) (Dexa) durante 4 hs y se determinó por citometría mediante la marcación de anexina V e IP como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra un ensayo representativo de otros 3 experimentos realizados de forma similar.

## A.2) Fagocitosis

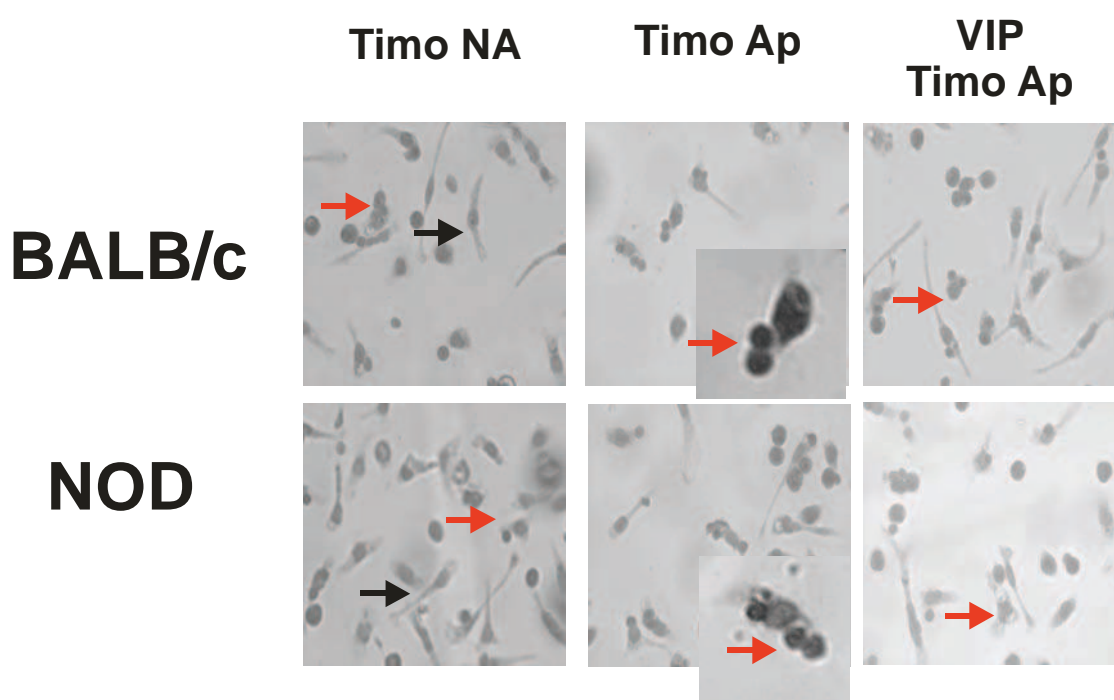
Luego de caracterizar la población de células apoptóticas estudiamos qué respuesta inducían estos timocitos en los macrófagos peritoneales de los ratones NOD prediabéticos de 16 semanas. Primero determinamos cómo estaba la función fagocítica de los macrófagos frente al estímulo apoptótico estudiando el porcentaje de fagocitosis (cantidad de macrófagos que tienen al menos una célula fagocitada) y el índice endocítico (cantidad de cuerpos apoptóticos endocitados por cada 100 macrófagos). Luego de ser cocultivados durante 90 minutos con timocitos apoptóticos. Para este experimento los macrófagos peritoneales aislados fueron cultivados en placas de 24 pocillos que contenían un cubreobjeto en el fondo para ser visualizados tanto en microscopio óptico, electrónico de barrido como confocal. Vale destacar que en estos experimentos se emplearon co-cultivos singeneicos, es decir macrófagos y timocitos de la misma cepa, y que las poblaciones de timocitos no apoptóticos NOD (NP) ya presentan un ligero aumento en la apoptosis temprana comparado con la cepa BALB/c. También se estudiaron dichos parámetros en presencia de VIP.

La figura 16 es una foto que representa los preparados teñidos con hematoxilina-eosina.

Las flechas rojas indican macrófagos que muestran uno o más timocitos fagocitados mientras que las flechas negras muestran a macrófagos sin células en su interior. De estos preparados se

obtuvieron los datos reflejados en la tabla 6.

La tabla 6 a) muestra el porcentaje de fagocitosis y se puede observar que los macrófagos de la cepa NOD presentan un mayor porcentaje de fagocitosis en condiciones basales, es decir cuando se los expone a timocitos sin inducir apoptosis (Timo NA). Luego en presencia de un estímulo fagocítico (Timo Ap) los macrófagos de ambas cepas fagocitan de manera similar y el VIP tiene escaso efecto sobre esta función. El índice de fagocitosis o endocítico (tabla 6) aumenta en presencia del estímulo fagocítico y el VIP disminuye este índice en ambas cepas.



**Figura 16. Cocultivo de macrófagos con timocitos apoptóticos. Microscopia de campo claro.**

Macrófagos peritoneales y timocitos fueron aislados. A los timocitos previamente se les indujo apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ). Ambas células fueron cocultivadas en una relación 1:5 durante 90 minutos como se describe en Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una tinción con Hematoxilina-eosina. Los preparados se observaron al microscopio de campo claro y se fotografiaron con un aumento 400X. Timo NA: timocitos no inducidos a apoptosis; Timo AP: timocitos apoptóticos. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 5 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD.

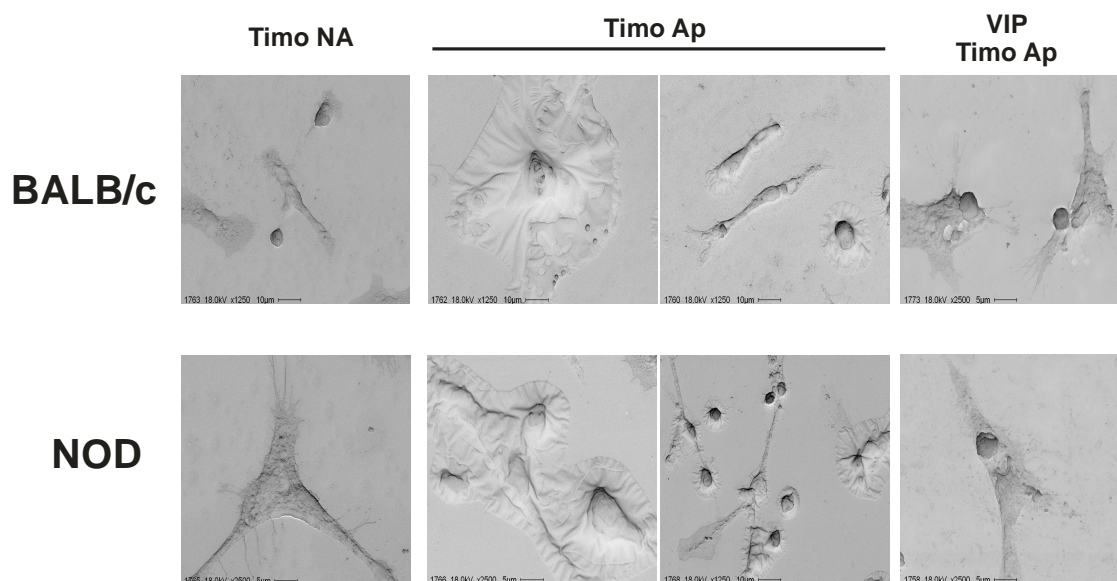
% de fagocitosis	Timo NA	Timo AP	Vip + timo AP
BALB/c	11,2±1,1	42,8±1.8 <sup>b</sup>	32,8±1.7 <sup>b</sup>
NOD	21,9±1,2 <sup>a</sup>	48,0±2.1 <sup>b</sup>	39,2±2.1 <sup>b</sup>

Índice endocítico	Timo NP	Timo AP	Vip + timo AP
BALB/c	24.3±1.8	72.4±7.6 <sup>B</sup>	50.3±4.7 <sup>C</sup>
NOD	24,0±2.4	75,0±8.1 <sup>B</sup>	56,0±6.2 <sup>C</sup>

**Tabla 6. Porcentaje e índice de fagocitosis del sistema macrófagos-timocitos.**

Macrófagos peritoneales y timocitos fueron aislados. A los timocitos inducidos o no a apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ) se los cocultivó en una relación 1:5 durante 90 minutos como se describe en Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio de campo claro y se obtuvieron los datos para obtener el porcentaje y el índice de fagocitosis. Timo NA: timocitos no inducidos a apoptosis; Timo AP: timocitos apoptóticos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. (a)  $P < 0.05$  vs. BALB/c. (b)  $P < 0.05$  vs. TIMO NA. (c)  $P < 0.05$  vs. Timo AP.

Las fotografías de la figura 17 son representativas de preparados observados por microscopía electrónica de barrido. En estas fotografías se observa la morfología de los macrófagos en condiciones basales y en presencia de timocitos apoptóticos. Con o sin VIP observamos un patrón similar.

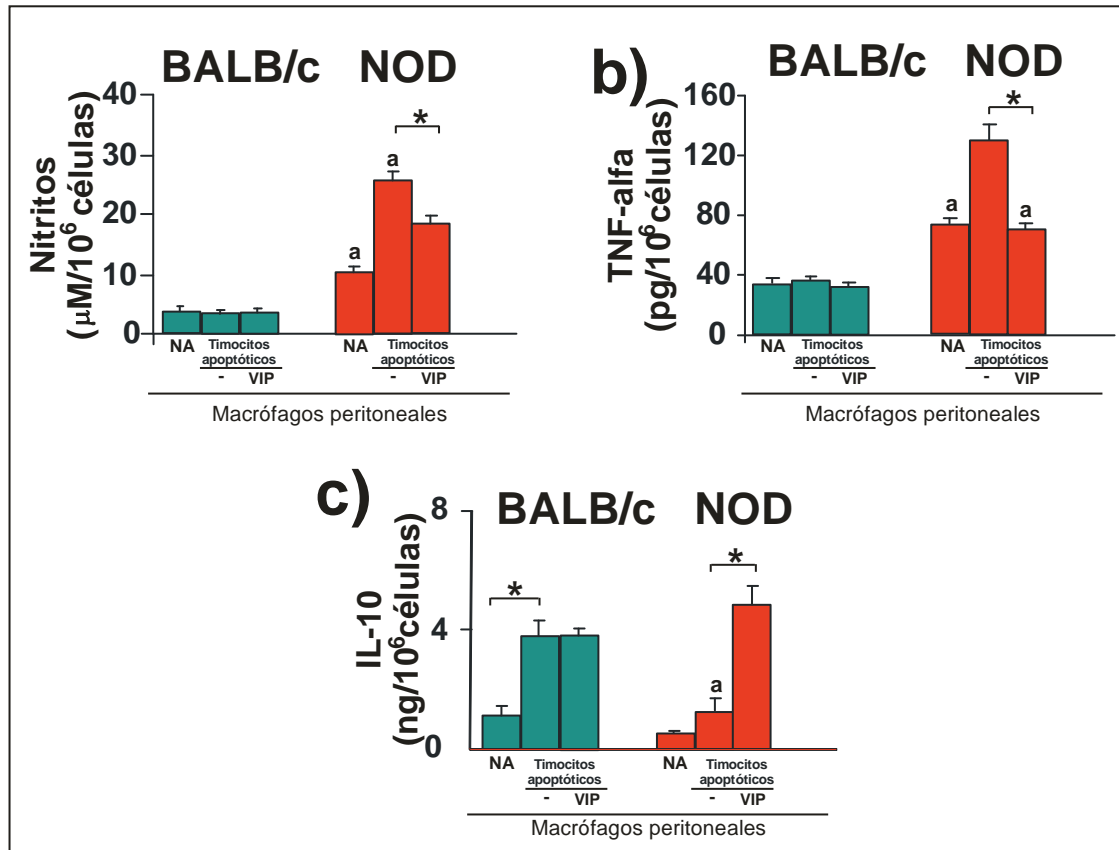


**Figura 17. Cocultivo de macrófagos con timocitos apoptóticos. Microscopia electrónica.**

Macrófagos peritoneales y timocitos fueron inducidos o no a apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ) se los cocultivó en una relación 1:5 durante 90 minutos como se describe en Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido como se indica en Materiales y Métodos. Timo NA: timocitos no inducidas a apoptosis; Timo AP: timocitos apoptóticos. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de 2 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD.

## A.3) Producción de mediadores por macrófagos

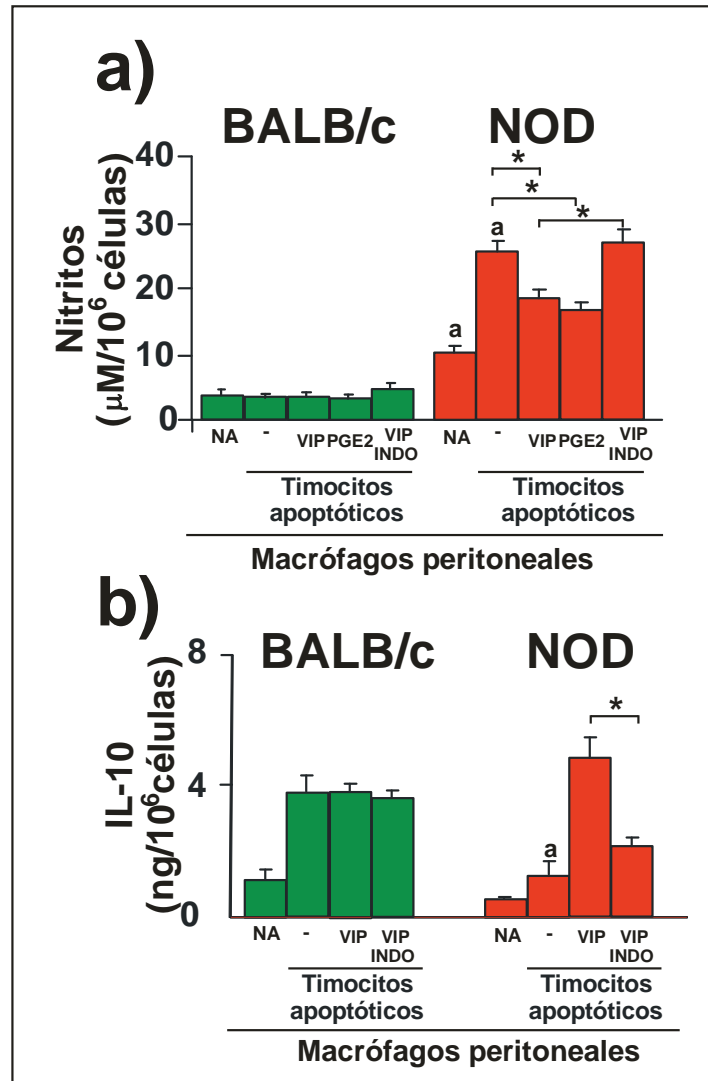
La figura 18 muestra que frente a células apoptóticas los macrófagos peritoneales de la cepa control BALB/c no responden con producción de mediadores inflamatorios mientras que sí observamos aumento de IL-10. En cambio los macrófagos peritoneales NOD presentan aumento de los mediadores inflamatorios tanto en condición basal como en presencia de los timocitos apoptóticos, no observándose aumento de IL-10. Asimismo el efecto de VIP en estos macrófagos es similar al observado con LPS, aumentando IL-10 y disminuyendo la producción de los mediadores inflamatorios (NO y TNF-alfa). Dado este resultado y lo observado con LPS, quisimos comprobar si en este proceso la  $\text{PGE}_2$  producida era responsable de disminuir la producción de nitritos y aumentar la producción de IL-10.



**Figura 18. Respuesta inflamatoria de los macrófagos NOD estimulados con células apoptóticas.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron cocultivados con timocitos de la misma cepa ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 90 min. Los sobrenadantes obtenidos luego de reemplazar a los timocitos por medio fresco e incubados durante 24 hs, fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess y TNF- $\alpha$  e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. (NA) representa a macrófagos que fueron cocultivados con timocitos no inducidos a apoptosis. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$ , (a)  $P < 0,05$  vs. correspondiente condición en BALB/c.

La figura 19 nos muestra que PGE2 agregada exógenamente, efectivamente disminuye la producción de nitritos inducidos por células apoptóticas sólo en macrófagos NOD.

A su vez esta figura muestra el efecto de PGE2 endógena sobre la producción de nitritos, donde se observa que indometacina ( $10^{-6}\text{M}$ ) (inhibidor no selectivo de COX) previene el efecto de VIP sobre los nitritos e IL-10 en macrófagos NOD.



**Figura 19. Efecto de PGE2 sobre macrófagos activados con timocitos apoptóticos.** Los macrófagos peritoneales fueron incubados con timocitos inducidos o no a apoptosis en presencia o ausencia de PGE2 ( $5 \times 10^{-8} \text{M}$ ), VIP ( $10 \times 10^{-7} \text{M}$ ) o Indometacina ( $10^{-6} \text{M}$ ) (INDO) durante 24 hs. Los sobrenadantes colectados fueron utilizados para determinar la producción de nitritos como se describe en materiales y métodos. (NA) representa a macrófagos que fueron cocultivados con timocitos no inducidos a apoptosis. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 3 experimentos. (a)  $P < 0,05$  vs. correspondiente en BALB/c. \* $P < 0,05$ .

### ***B) Señales intracelulares involucradas y cinética de fagocitosis.***

Del mismo modo que con LPS, estudiamos la participación de NF- $\kappa$ B en los efectos inducidos por co-incubación con células apoptóticas.

Nuevamente como una señal de activación de esta vía estudiamos la translocación desde el citoplasma al núcleo de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B por microscopía confocal. Para ello estimulamos a los macrófagos en diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min) con timocitos a los cuales previamente se les indujo apoptosis.

#### ***- Condiciones basales y respuesta a timocitos apoptóticos:***

La figura 20 muestra que hay translocación de p65 en condiciones basales en macrófagos NOD, tal como observamos en las condiciones basales de los experimentos realizados con LPS. Similarmente, este resultado es consistente con los mayores niveles de nitritos observados en macrófagos NOD cocultivados con timocitos no apoptóticos (figura 19).

Cuando cocultivamos a los macrófagos con los timocitos apoptóticos observamos, en las fotografías ampliadas de los núcleos, que en los ratones controles la translocación del factor nuclear se produce ya a los 15 min, mientras que en los macrófagos NOD la translocación se produce más tarde y no guarda la misma cinética que en los controles. Debajo de las fotografías se halla representada la intensidad de fluorescencia de la señal en el núcleo en las diferentes condiciones en la que fueron expuestas los macrófagos de cada cepa (basal, AP15, AP30, AP60 y AP90), en esta representación podemos observar que en los macrófagos BALB/c la máxima intensidad de fluorescencia corresponde a los macrófagos en contacto con los timocitos durante 30 min y decrece desde ese momento hasta 90 min, mientras que en NOD, el aumento recién se ve a los 90 min.



Macrófagos peritoneales cocultivados con timocitos apoptóticos durante 15, 30, 60 y 90 min (Ap15 a Ap90) y con timocitos no inducidos a apoptosis (Timo NA). Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a -20°C y

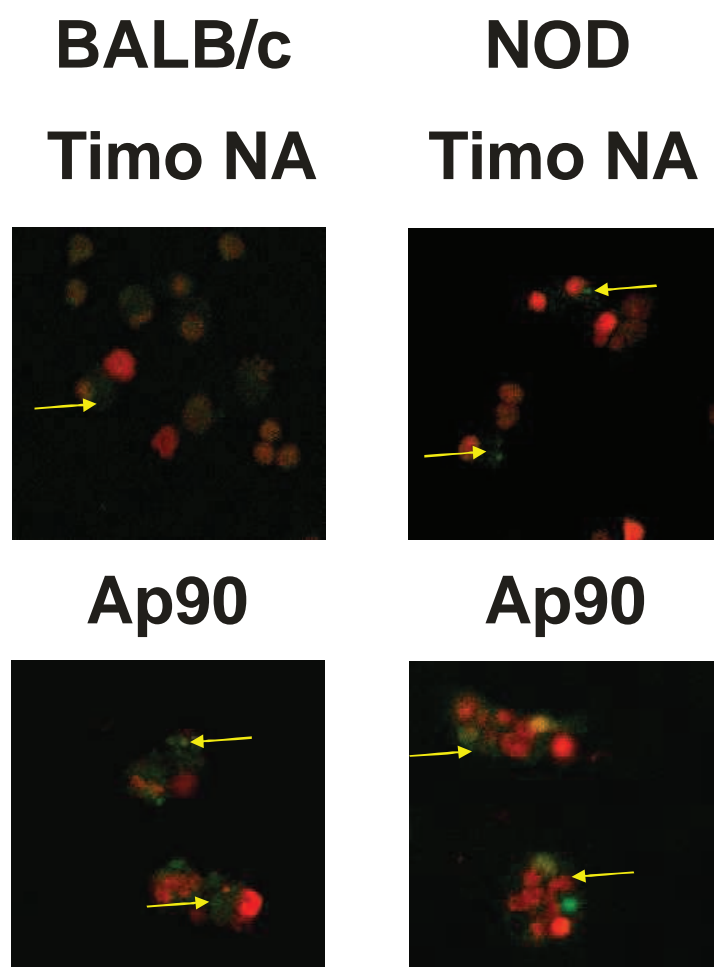


## RESULTADOS

se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las barras representadas debajo de cada columna son representativas de las fotografías ampliadas utilizando Adobe Photoshop CS3 para poder determinar la intensidad fluorescente de los núcleos mediante el programa ImageJ. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 4 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD. \* $P < 0.05$  vs barras indicadas.

Para confirmar que las células incluidas en el citoplasma tal como se ve con tinción de p65 eran timocitos apoptóticos fagocitados realizamos un ensayo de terminal TUNEL (deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling).

En la figura 21 observamos que las zonas fluorescentes verdes presentes alrededor de los núcleos rojos, efectivamente marcan cuerpos apoptóticos.



**Figura 21. Confirmación de apoptosis mediante TUNEL.**

Macrófagos peritoneales fueron tratados con timocitos (con (Ap90) y sin inducir apoptosis (timo NA)) durante 90 min. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células y se realizó la técnica de TUNEL como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 3 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD.

Más aún, la figura muestra que los macrófagos NOD incubados con la población de timocitos de ratones NOD no inducidos con dexametasona también presentan marca fluorescente, sin embargo, se observó mas marca fluorescente en los macrófagos en contacto con timocitos inducidos con dexametasona.

Con el objetivo de confirmar la cinética observada por microscopía confocal, se realizaron preparados a los cuales se los tiñó con hematoxilina-eosina, para determinar el porcentaje y el índice de fagocitosis en eso tiempos.

En la tabla 7 a) se representa el porcentaje de fagocitosis. Podemos ver que los macrófagos peritoneales de los ratones NOD, presentan un porcentaje de fagocitosis similar a ratones normales en las diferentes condiciones (AP15, AP30, AP60 y AP90). En la condición basal en ratones NOD observamos una mayor capacidad para endocitar cuerpos apoptóticos que en los BALB/c.

En la tabla 7 b) observamos que en la condición AP30 y AP60 los macrófagos de NOD presentan un reducido índice de endocitosis respecto a los BALB/c que se equipara al de BALB/c a los 90 min.

a)

% de Fagocitosis	basal	AP15	AP30	AP60	AP90
BALB/c	11.2±0.1	39.4±0.3	44.2±0.8	50.0±0.7	42.8±1.8
NOD	21.9±0.2 <sup>a</sup>	44.2±1.2	46.5±1.1	47.2±2.1	48.0±2.1

b)

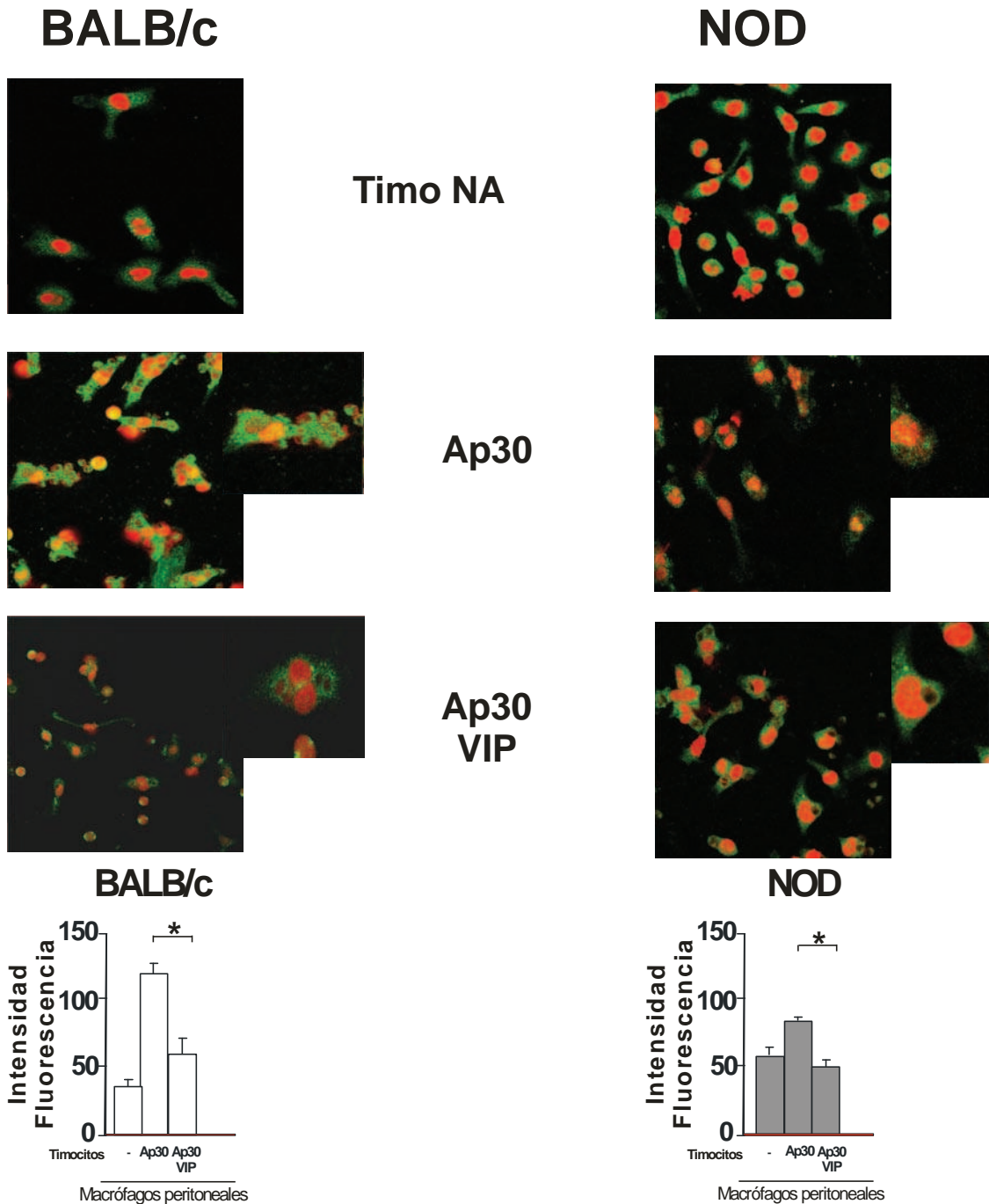
Indice endocítico	basal	AP15	AP30	AP60	AP90
BALB/c	24.3±1.8	24.8±1.1	80.5±1.8	89.6±1.7	72.4±7.6
NOD	24.0±2.4	44.3±2.2 <sup>a</sup>	58.7±2.1 <sup>a</sup>	67.4±2 <sup>a</sup>	75.0±8.1

**Tabla 7. Porcentaje e índice de fagocitosis del sistema macrófagos-timocitos.**

Macrófagos peritoneales y timocitos fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. A los timocitos previamente se les indujo apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ). Ambas células fueron cocultivadas en una relación 1:5 durante diferentes tiempos hasta 90 minutos (AP15 a AP90) como se describe en Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio óptico y se obtuvieron los datos para obtener el porcentaje (a) y el índice de fagocitosis (b). Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. (a)  $P < 0,05$  vs. correspondiente condición BALB/c.

Para estudiar el efecto de VIP en la translocación de p65, y sabiendo que la translocación en BALB/c era máxima a los 30 min, realizamos un cocultivo de 30 min de los macrófagos de ambas cepas y los timocitos apoptóticos.

En la figura 22 observamos que tanto en los ratones BALB/c como en los NOD el VIP inhibe la translocación del factor y además VIP disminuye el índice endocítico a los 30 min de manera más significativa en la cepa BALB/c (BALB/c: AP30  $80.5 \pm 1.8$ , AP30+VIP  $57 \pm 1.2^a$ ; NOD: AP30  $58.7 \pm 2.1$ , AP30+VIP  $47 \pm 0.9$ ;  $a P < 0.05$ )



**Figura 22. Translocación de p65 en macrófagos peritoneales de hembras preñadas inducidos con timocitos apoptóticos en ausencia y presencia de VIP.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con timocitos apoptóticos y VIP (10-7M) durante 30 min (Ap30) y con timocitos no apoptóticos (Timo NP). Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a 20°C y se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF-κB como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las barras representadas debajo de cada columna son representativas de las fotografías ampliadas utilizando Adobe photoshop CS3 para poder determinar la intensidad fluorescente de los núcleos mediante el programa ImageJ. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 3 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD. \*P<0.05 vs. barras indicadas.

### ***Conclusiones Parte 3: Respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo fagocítico.***

Los resultados presentados hasta aquí indican que los macrófagos extraídos en condiciones de reposo de la cavidad peritoneal de ratones NOD prediabéticos y enfrentados con un estímulo fagocítico no inflamatorio como son los timocitos apoptóticos, presentan un porcentaje de fagocitosis similar y diferencias en la cinética de endocitosis de cuerpos apoptóticos, con una velocidad menor que en NOD. Por otro lado, los macrófagos NOD producen mediadores pro-inflamatorios en el proceso de fagocitosis y menor cantidad de IL-10. Estos macrófagos presentan un perfil de activación aberrante ante un estímulo fagocítico, que no se observa en los macrófagos BALB/c. Por su parte, en macrófagos NOD el VIP modula la respuesta inflamatoria del mismo modo que frente a LPS actuando a través de la producción de IL-10 y metabolitos de COX, como por ejemplo la PGE2, que limitan la producción de nitritos.

Por otra parte, los resultados indican que los macrófagos peritoneales de ratones NOD prediabéticos cocultivados con células apoptóticas presentan una translocación basal de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B confirmando las observaciones previas acerca de que ya se encuentran activados. En cambio los ratones controles BALB/c requieren del estímulo fagocítico para que la subunidad p65 se transloque al núcleo. En cuanto al efecto de VIP, en los macrófagos de ambas cepas observamos que inhibe la translocación del factor NF- $\kappa$ B y reduce levemente el índice endocítico.

## Parte 4: Respuesta de los macrófagos peritoneales a timocitos apoptóticos durante la Preñez.

### A) Perfil de activación

#### A.1) Fagocitosis:

Lo primero que evaluamos es si la preñez modifica los efectos observados en cuanto al proceso de fagocitosis. Para ello realizamos el cocultivo utilizando macrófagos de hembras preñadas en el día 9 de gestación y timocitos inducidos con dexametasona..

En la tabla 8 podemos observar que los macrófagos NOD nuevamente presentan un porcentaje e índice de fagocitosis similar al control y también se ve una disminución en el índice de fagocitosis. En este caso los tiempos de incubación fueron de 90 minutos, pero a los 60 minutos también se vio disminuido este índice (dato no mostrado)

% de fagocitosis	basal	Timo AP	Vip+timo AP
BALB/c	11.2±0.1	33.3±2.8	32.0±1.6
NOD	11.9±0.2	31.0±2.1	32.0±2.1

Indice endocítico	basal	Timo AP	Vip+timo AP
BALB/c	24.3±1.8	56.4±5.8	52.0±4.6
NOD	24.0±2.4	37±3.6 <sup>a</sup>	34.7±3.2 <sup>a</sup>

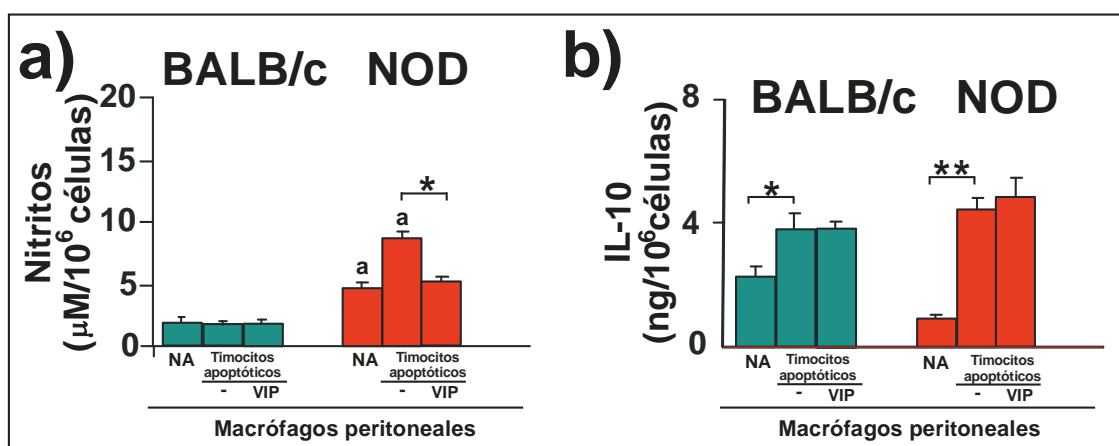
**Tabla 8. Porcentaje e índice de fagocitosis del sistema macrófagos-timocitos durante la preñez.**

Macrófagos peritoneales extraídos de hembras preñadas en el día 9 de gestación fueron aislados y cocultivados con timocitos. A los timocitos previamente se les indujo apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ). Ambas células fueron cocultivadas en una relación 1:5 en presencia o ausencia de VIP ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ), durante 90 minutos como se describe en

Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio de campo claro y se obtuvieron los datos para calcular el porcentaje (a) y el índice de fagocitosis (b). Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. (a)  $P < 0.05$  vs. BALB/c.

## A.2) Mediadores

Dado que en el día 9 de gestación habíamos observado que la producción de nitritos en respuesta a LPS se halla normalizada en los macrófagos de la cepa NOD y que esto podría deberse a los altos niveles de IL-10 observados, quisimos investigar cómo se encontraban estos dos mediadores, nitritos e IL-10, cuando el estímulo, en lugar de inflamatorio, es fagocítico. Se realizaron cocultivos utilizando los macrófagos peritoneales aislados de hembras preñadas en el día 9 de gestación y el sobrenadante se utilizó para determinar la producción de nitritos e IL-10. En la figura 23 a) observamos que los macrófagos de la cepa NOD producen nitritos tanto en condición basal (timocitos no apoptóticos) como en respuesta al estímulo apoptótico, sin embargo dicha producción es significativamente menor que los valores obtenidos en hembras vírgenes (figura 19). Asimismo en la figura 23 b) vemos que en ambas cepas el estímulo apoptótico es suficiente para producir IL-10 a diferencia de lo que ocurría en no preñadas donde los macrófagos NOD necesitaban del VIP para la producción de IL-10.



**Figura 23. Respuesta inflamatoria de los macrófagos NOD de hembras preñadas estimulados con células apoptóticas.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron cocultivados con timocitos ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 90 min. Los sobrenadantes obtenidos luego de reemplazar a los

timocitos por medio fresco e incubado durante 24 hs, fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \*P<0,05; \*\*P<0.01; (a) P<0,05 vs. correspondiente condición en BALB/c.

### ***B) Señales intracelulares y cinética de fagocitosis***

Dado que la producción de nitritos es menor en los macrófagos peritoneales de hembras NOD preñadas, quisimos investigar la activación de NF-kB en el sistema cocultivo macrófago peritoneal + timocito apoptótico, por lo cual se realizaron los cocultivos utilizando los macrófagos peritoneales obtenidos de hembras preñadas en el día 9 y se realizó microscopia confocal para observar la translocación de p65.

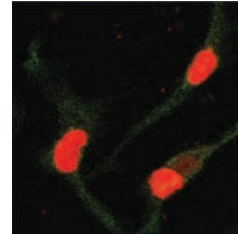
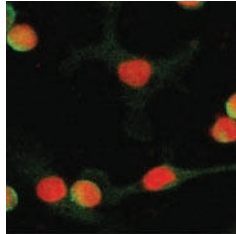
La figura 24 muestra que, a diferencia de las hembras NOD vírgenes, en el día 9 de gestación se observa translocación de p65 a los 30 min similar a lo que sucede con las hembras BALB/c y un perfil cinético similar en ambas cepas.



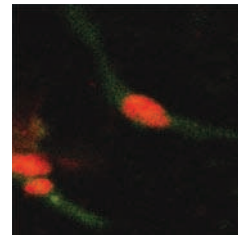
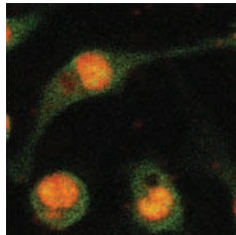
## BALB/c

## NOD

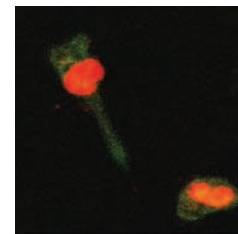
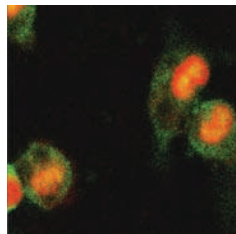
Timo NA



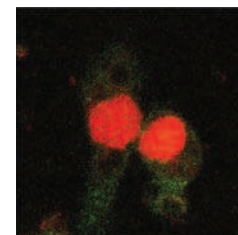
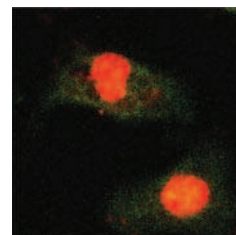
Ap15



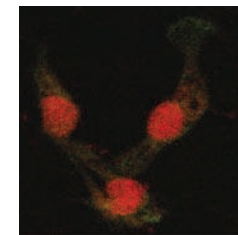
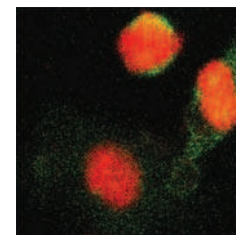
Ap30



Ap60

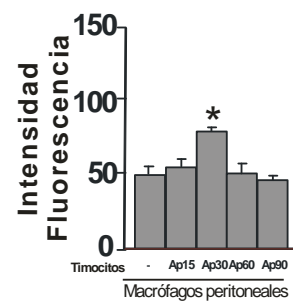
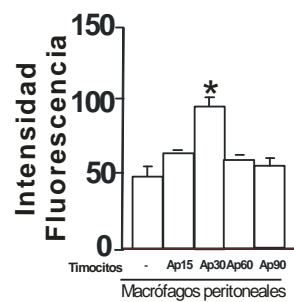


Ap90



## BALB/c

## NOD



## RESULTADOS

**Figura 24: Translocación de p65 en macrófagos peritoneales de hembras preñadas inducidos con timocitos apoptóticos.**

Macrófagos peritoneales fueron tratados con timocitos apoptóticos durante 15, 30, 60 y 90 min (Ap15, Ap30, Ap60 y Ap90) y con timocitos no inducidos a apoptosis (Timo NA). Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar la subunidad p65 del NF-kB como se indica en Materiales y Métodos. Los preparados se observaron al microscopio confocal y se fotografiaron con un aumento 400X. Las barras debajo de cada figura son representativas de las fotografías ampliadas utilizando Adobe Photoshop CS3 para determinar la intensidad fluorescente de los núcleos mediante el programa ImageJ. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado y de al menos 3 experimentos similares con muestras de distintos ratones BALB/c y NOD. \* $P < 0.05$  vs. Basal..

Con el objetivo de confirmar la cinética observada por microscopía confocal, se realizaron preparados a los cuales se los tiñó con hematoxilina-eosina, para determinar el porcentaje y el índice de fagocitosis en algunos de esos tiempos.

En la tabla 9a) se representa el porcentaje de fagocitosis. Podemos ver que los macrófagos peritoneales de los ratones NOD, presentan un porcentaje de fagocitosis similar a ratones normales en las diferentes condiciones (AP15, AP30, AP60 y AP90).

En la tabla 9b) observamos que los macrófagos de NOD presentan un reducido índice de endocitosis respecto a los BALB/c en todas las condiciones estudiadas que equipara al de BALB/c a los 90 min.

VIP no modificó ni el porcentaje ni el índice endocítico en ninguna de las dos cepas

a)

% de Fagocitosis	basal	AP30	AP30 VIP	AP90	AP90 VIP
BALB/c	11.2 $\pm$ 0.1	34.4 $\pm$ 0.3	34.2 $\pm$ 0.8	33.3 $\pm$ 2.8	30.0 $\pm$ 0.7
NOD	11.9 $\pm$ 0.2	34.2 $\pm$ 1.2	36.5 $\pm$ 1.1	31.0 $\pm$ 2.1	37.2 $\pm$ 2.1

b)

Índice endocítico	basal	AP30	AP30 VIP	AP90	AP90 VIP
BALB/c	24.3 $\pm$ 1.8	44.8 $\pm$ 4.1	50.5 $\pm$ 4.8	56.4 $\pm$ 5.8	52.0 $\pm$ 4.6
NOD	24.0 $\pm$ 2.4	34.3 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	38.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	37.0 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	34.7 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>

**Tabla 9. Cinética de fagocitosis del sistema macrófagos-timocitos y efecto de VIP durante la preñez.**

Macrófagos peritoneales extraídos de hembras preñadas en el día 9 de gestación fueron aislados y cocultivados con

## RESULTADOS

---

timocitos. A los timocitos previamente se les indujo apoptosis con dexametasona ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ). Ambas células fueron cocultivadas en una relación 1:5 durante diferentes tiempos hasta 90 minutos (AP15 a AP90) como se describe en Materiales y Métodos, cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio óptico y se obtuvieron los datos para obtener el porcentaje (a) y el índice de fagocitosis (b). Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. (a)  $P < 0,05$  vs. correspondiente condición BALB/c.

### ***Conclusiones Parte 4: Respuesta de los macrófagos peritoneales a timocitos apoptóticos durante la Preñez.***

Las hembras NOD durante la preñez presentan un porcentaje de fagocitosis similar al de las hembras BALB/c.

Presentan una menor inducción de nitritos en presencia del estímulo apoptótico y ya se induce la producción de IL-10 por este estímulo, es decir no requiere de VIP. Por otra parte, cabe destacar, que con respecto a la translocación del factor NF- $\kappa$ B, no se observa translocación a nivel basal como se veía en los macrófagos NOD en diestro la cinética de translocación es similar al de la cepa control.

## Parte 5: Acinos apoptóticos como estímulo para la fagocitosis

Teniendo en cuenta que los acinos de ratones NOD de 16 semanas de edad presentan marcadores de apoptosis en condiciones basales (Calafat et al 2009) evaluamos la respuesta de los macrófagos de hembras NOD ahora frente a estos acinos como una aproximación a la posible interacción entre macrófagos y acinos en las glándulas. Determinamos la fagocitosis y producción de los mismos mediadores pro y anti-inflamatorios. Asimismo, analizamos la respuesta de los macrófagos al VIP y el efecto de la gestación

### A) Fagocitosis:

Determinamos el porcentaje y el índice de fagocitosis. En la tabla 10 se ve que, a diferencia con lo observado con los timocitos apoptóticos, los macrófagos peritoneales no fagocitan a los cuerpos apoptóticos provenientes de las células acinares en los tiempos utilizados estando todos los valores obtenidos en un porcentaje de fagocitosis basal. Vale mencionar, sin embargo, que el índice de endocitosis mantiene el efecto observado con timocitos, es decir, que los NOD muestran menor avidéz en la endocitosis de cuerpos apoptóticos. El VIP no modificó estos efectos.

a)

% de fagocitosis	acino 16 sem	Vip+acino 16 sem
BALB/c	6.3±1.1	7.0±1.1
NOD	3.8±0.2	6.0±0.9

b)

Índice endocítico	acino 16 sem	Vip+acino 16 sem
BALB/c	11.0±1.4	11.8±1.4
NOD	6.3±1.1	6.3±1.2

**Tabla 10 .Porcentaje e índice de fagocitosis del sistema macrófagos-acinos.**

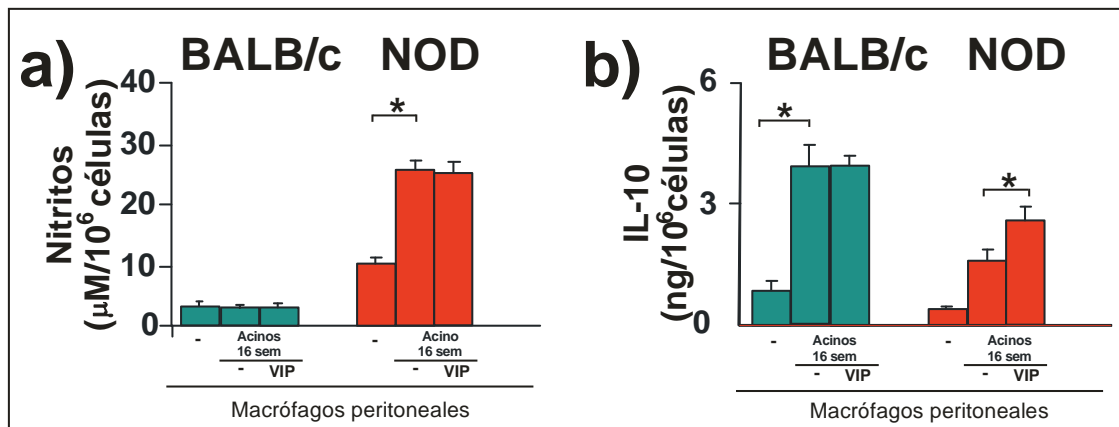
Macrófagos peritoneales extraídos de hembras no preñadas fueron aislados y cocultivados con acinos de 16 semanas. Ambas células fueron cocultivadas en una relación 1:5 en presencia o ausencia de VIP ( $1 \times 10^{-7}$  M), durante

## RESULTADOS

90 minutos como se describe en Materiales y Métodos. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con paraformaldehído 4% y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio óptico y se obtuvieron los datos para calcular el porcentaje (a) y el índice de fagocitosis (b). Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 3 experimentos.

### B) Mediadores:

De igual forma que con timocitos, quisimos analizar los mediadores nitritos e IL-10 estudiados. En la figura 25 se muestra un comportamiento similar al observado en las situaciones descriptas antes: una mayor respuesta inflamatoria en la cepa NOD frente a acinos, similar a la observado con LPS y timocitos apoptóticos, y por otro que lado la producción de IL-10 requiere de la presencia de VIP. Confirmamos en los tiempos del cocultivo los acinos no producen niveles detectables de nitritos ni IL-10.

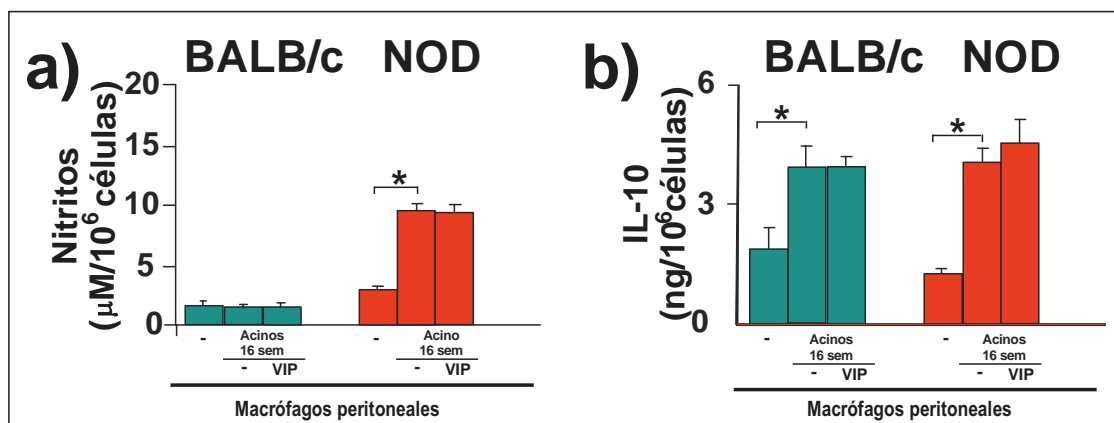


**Figura 25. Respuesta inflamatoria de los macrófagos NOD estimulados con células acinares apoptóticas.** Los macrófagos peritoneales ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron cocultivados con acinos de 16 semanas (3 mg/ml de proteínas) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 90 min. Los sobrenadantes obtenidos luego de reemplazar a los acinos por medio fresco e incubado durante 24 hs, fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 3 experimentos. \* $P < 0.05$ .

## C) Efecto de la gestación en el dialogo macrófagos-acinos.

Se realizaron cocultivos utilizando los macrófagos peritoneales obtenidos de hembras preñadas en el día 9 de gestación y Acinos homólogos, y el sobrenadante se utilizó para determinar la producción de nitritos e IL-10.

En la figura 26 a) observamos que los macrófagos de la cepa NOD producen nitritos tanto en condición basal como en respuesta al estímulo fagocítico, sin embargo dicha producción es significativamente menor que los valores obtenidos cuando no están preñadas. Asimismo en la figura 26 b) vemos que en ambas cepas el estímulo apoptótico es suficiente para producir IL-10 a diferencia de lo que ocurría cuando no estaban preñadas donde los macrófagos NOD necesitaban del VIP para la producción de IL-10.



**Figura 26. Respuesta inflamatoria de los macrófagos NOD de hembras preñadas estimulados con células acinares apoptóticas.** Los macrófagos peritoneales extraídos de hembras BALB/c y NOD en el día 9 de gestación ( $0.5 \times 10^6$ /pocillo) fueron cocultivados con acinos de 16 semanas (3 mg/ml de proteínas) en presencia o ausencia de VIP ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 90 min. Los sobrenadantes obtenidos, luego de reemplazar a los acinos por medio fresco e incubado durante 24 hs, fueron utilizados para determinar la producción de nitritos por Griess e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$

Cuando se analizaron los preparados teñido con H&E no se observó porcentaje de fagocitosis mayores al 4% en ninguna de las cepas ni condiciones.

### ***Conclusiones Parte 5: Acinos apoptóticos como estímulo para la fagocitosis***

Por lo tanto podemos concluir que los macrófagos enfrentados a acinos muestran un menor porcentaje de fagocitosis de cuerpos apoptóticos comparado con timocitos apoptóticos, sin embargo a los 90 min el índice de endocitosis en los NOD parece aún menor respecto de los BALB/c. La actividad fagocítica en los macrófagos NOD está asociada a la producción de nitritos y bajos niveles de IL-10. En el día 9 de gestación se normaliza la producción de mediadores en NOD.

Las hembras NOD durante la preñez presentan una menor inducción de nitritos en presencia de los acinos y ya se induce la producción de IL-10 por este estímulo, es decir no requiere de VIP.



### Discusión

Los macrófagos son células versátiles capaces de poner en acción diferentes programas dependiendo del microambiente en el que son reclutadas o estimuladas. Tienen un papel destacado en el organismo no sólo por el espectro amplio de funciones que pueden desarrollar o en las que colaboran al accionar dichos programas, sino también por el variado repertorio de receptores que expresan y mediadores que producen. Los macrófagos pueden integrar de este modo, o con esta 'interlocución', señales de los sistemas de mantenimiento de la homeostasis del organismo como el sistema nervioso, el inmune y el endocrino.

Su localización ubicua, su capacidad de migrar rápidamente del compartimiento plasmático como monocitos a los tejidos y diferenciarse, y su diversidad de funciones efectoras, que pueden requerir sólo segundos para activarse y/o permanecer durante días luego del estímulo, ponen en evidencia un espectro de estados funcionales: Actúan como centinelas en los tejidos y como enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa, modulan el crecimiento de células tumorales, facilitan procesos de cicatrización y de remodelación tisular, son fagocitos profesionales para la remoción de células senescentes, detritos celulares y micro-organismos, entre otras funciones.

En este marco, y teniendo en cuenta las características señaladas de los ratones NOD en la etapa prediabética, el trabajo que presentamos enfoca la respuesta de los macrófagos de estos ratones frente a dos tipos de estímulos, inflamatorio y fagocítico, y la posible modulación de los mismos por el neuropéptido VIP y durante la gestación.

Los resultados descriptos permiten concluir que los macrófagos de hembras NOD en la etapa prediabética normoglucémica, tienen un perfil de activación diferencial en condiciones basales y frente a ambos estímulos, con un aumento de producción de mediadores pro-inflamatorios como NO, TNF- $\alpha$  e IL-12 y aumento de PGE2 sin producción de IL-10. A su vez, vías de señalización intracelular asociadas a la respuesta pro-inflamatoria como el NF-kB también se encuentran activadas ya en estado de reposo y no mantienen la misma cinética de activación que en los macrófagos de ratones controles.

Los macrófagos, como células fagocíticas residentes o reclutadas en los tejidos, cumplen funciones de mantenimiento de la homeostasis tisular removiendo 'desechos celulares' en un contexto de supresión de la respuesta inflamatoria. Esta función centinela se encuentra alterada en los macrófagos NOD, ya que no sólo difieren en la función fagocítica frente a timocitos apoptóticos sino que no muestran la producción de

mediadores finamente regulada requerida, comparados con la cepa control. En la misma línea, los resultados de la interacción de macrófagos con acinos de glándulas salivales también muestran una respuesta defectuosa en macrófagos NOD.

Finalmente, consistente con su papel integrador de señales diversas, el tratamiento de macrófagos *in vitro* con el neuropéptido VIP, por un lado, y la gestación temprana por otra parte, ejercen una modulación de estas funciones celulares. Los macrófagos NOD muestran una reversión por estos tratamientos o procesos en algunas de las respuestas deletéreas, aunque no en todas las determinadas en este trabajo.

La población de macrófagos empleada en los experimentos se identificó con el anticuerpo F4/80 mAb también conocido en menor medida como anti-Ly-71 (McKnight, A. J et al 1996). Este es un marcador de macrófagos maduros, aunque eosinófilos y células dendríticas también pueden reaccionar con el anticuerpo. No se reportaron homólogos humanos para F4/80 sino que se usa anti-CD14, pero este último utilizado en ratones da una señal muy baja y en algunos casos no detectable (Lily L et al 1998). Otro marcador comúnmente usado para identificar monocitos/macrófagos es CD11b también conocido como (Mac-1), sin embargo es expresado por diversas células inmunes como células *natural killer* (NK), granulocitos, células T y células B B-1 peritoneales (Lily L et al 1998). Realizamos marcaciones por citometría utilizando anti-CD11b y obtuvimos un porcentaje mayor e inespecífico comparado con F4/80, consistente con la mayor variedad de tipos celulares marcados, por lo tanto para caracterizar la población de macrófagos utilizamos siempre anti-F4/80.

### Parte 1:

En primer lugar analizamos el perfil de activación de los macrófagos peritoneales de hembras NOD prediabéticas en condiciones de reposo y frente a un estímulo inflamatorio, como es el LPS. Además, siendo el VIP un péptido abundante en el sistema inmune que modula tanto respuestas inflamatorias como nerviosas/secretorias, estudiamos el efecto inmunomodulador en el modelo.

Demostramos que los macrófagos NOD presentan un perfil de activación diferente al observado en macrófagos peritoneales de hembras controles BALB/c, siendo menos efectivos para regular la producción de nitritos y citoquinas Th1. Los macrófagos NOD producen mayores niveles de nitritos, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 tanto en condiciones basales como estimulados con LPS y, frente a LPS, no incrementan la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Es importante destacar que estos macrófagos son residentes peritoneales, es decir, no han sido previamente estimulados con algún agente inflamatorio no microbiano,

como caseína estéril, peptona, tioglicolato, aceite mineral o glucógeno, los cuales inducen la diferenciación de los macrófagos a un estado inflamatorio estimulado o respondedor. Esto permite analizar el perfil de los macrófagos NOD en condiciones basales y las diferencias en su estado de activación inmediatamente después de extraídos de los ratones, en los que aun no se detectan infiltrados en las glándulas salivales y la respuesta contra islotes pancreáticos es muy incipiente como se indicó en la caracterización del modelo. Se han informado diferencias en el perfil de activación de los macrófagos NOD al inicio y durante la etapa diabética. Mohammad y colaboradores (2006) trabajando con macrófagos derivados de médula ósea de ratones NOD diabéticos estimulados *in vitro* con LPS describió un aumento en iNOS, TLR3, TLR4 y las citoquinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, todos mediadores pro-inflamatorios y también observó aumento en IL-10 aunque menor que en los controles, todos medidos por RT-PCR. Los mismos autores encontraron las citoquinas IL-12p40, IL-6 y TNF- $\alpha$  aumentadas en macrófagos de ratones NOD de 16 a 20 semanas considerados en el inicio de la diabetes por su perfil glucémico, sin embargo no encontraron diferencias en los niveles basales entre NOD y controles. Cabe señalar que estas células fueron obtenidas de médula ósea como progenitores y diferenciados a macrófagos *in vitro* con M-CSF. Stoffels K y colaboradores (Stoffels K et. al 2004) reportaron aumentos en IL-12p40, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneales de ratones NOD diabéticos inducidos con LPS e IFN- $\gamma$  por 6 y 24 horas.

También determinamos que el perfil de activación no variaba en los diferentes estadios del ciclo estral en los ratones NOD. Dado que, como se mencionó más arriba, elegimos trabajar con macrófagos peritoneales residentes con un rendimiento de células extraídas por ratón reducido, en algunos ensayos sólo evaluamos dos estadios del ciclo, proestro y diestro, elegidos por su diferencia en la carga hormonal, destacando que no se observaron diferencias entre estos estadios en los mediadores determinados en macrófagos NOD ni en controles. Si bien se han descrito variaciones por estrógenos y progesterona en las respuestas de los macrófagos ante la injuria de tejidos en ratones normales, estas diferencias se observan principalmente en tratamientos *in vitro* de cultivos de macrófagos con las hormonas o, cuando se analiza modulación *in vivo*, las diferencias informadas son entre hembras tratadas o no con estrógenos, entre hembras y machos, o entre hembras ovariectomizadas y controles y aún así dependen de los estímulos inflamatorios (Bird MD et. al 2008). En estas condiciones los estrógenos, por ejemplo, ejercen un efecto inductor de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos peritoneales: en hembras normales ovariectomizadas se informó una reducción en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-6 frente a una injuria tisular, niveles que se restauraron con tratamiento de estrógenos. Sin embargo, las diferencias se vieron

comparando hembras ovariectomizadas con hembras con operación simulada (*sham*) en proestro, siendo las diferencias en la carga hormonal de ambos grupos significativamente mayores que durante los distintos estadios del ciclo estral. Incluso esta tendencia es inversa para  $\text{TNF-}\alpha$  en el mismo diseño experimental (Bird et. al 2008). En ratones NOD se ha informado dimorfismo sexual en la producción de citoquinas a nivel del páncreas con un predominio Th1 sobre Th2, pero no encontramos referencias sobre variaciones en los niveles de citoquinas producidas por macrófagos durante los estadios del ciclo estral. Los resultados obtenidos en macrófagos peritoneales están en línea con resultados previos sobre las concentraciones plasmáticas de citoquinas pro-inflamatorias en hembras NOD de la misma edad que no varían durante el ciclo estral (Roca et al 2006).

En segundo lugar analizamos el efecto del neuropéptido VIP y la posible interacción entre mediadores producidos por los macrófagos NOD estimulados con LPS con o sin VIP. VIP inhibe la producción de nitritos,  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-12 e incrementa la producción de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS de ratones NOD, revirtiendo en gran medida la respuesta observada en NOD. Se demuestra además, que VIP modula la producción de nitritos a través de la producción de IL-10 y metabolitos de COX como por ejemplo PGE2, ya que el efecto de VIP para prevenir la producción de nitritos fue inhibido por un anticuerpo anti-IL-10 y se observó un efecto aditivo de IL-10 exógena y VIP sólo en macrófagos NOD. Asimismo, PGE2 incrementó los niveles de IL-10 y disminuyó los nitritos en forma similar al efecto de VIP; y el inhibidor no selectivo de COX indometacina revirtió el efecto de VIP tanto sobre la producción de IL-10 como de nitritos, consistente con lo observado con PGE2 exógena. Incluso VIP solo (sin estímulo inflamatorio) incrementó IL-10 y PGE2 en macrófagos de ambas cepas poniendo en evidencia la participación de estos tres mediadores en el mecanismo de acción.

Se ha propuesto que la regulación mutua entre iNOS y COX también tiene lugar en modelos inflamatorios que involucran activación de IL-1 $\beta$  e IL-10 (Cheon HJ et al 2006; Tetsuka T et al 1994). Se demostró que la IL-10 suprime la producción de NO y  $\text{TNF-}\alpha$  en macrófagos activados con LPS (Moore KW et al 2001). Asimismo, en ratones NOD diabéticos el tratamiento con IL-10 recombinante retrasa y reduce la incidencia de diabetes, disminuye la severidad de la insulitis y de infiltrados linfocitarios normalizando la producción de insulina (Pennline KJ et al 1994). Más aún una alta concentración endógena de esta citoquina es considerada como un marcador de pronóstico positivo en enfermedades autoinmunes humanas como por ejemplo lupus eritematoso sistémico y desórdenes autoinmunes relacionados (Goldman M, et al 1996).

PGE2 inhibe la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias no sólo en macrófagos sino también en otros tipos celulares como células dendríticas (Huie Jing et al 2003).

VIP promueve la síntesis de IL-10 y reduce la inducción de iNOS y la producción de citoquinas Th1 en macrófagos de ratón estimulados con LPS tanto *in vivo* como *in vitro* (Gomariz RP et al 2006; Delgado M et al 2004; Delgado M et al 1999). En particular, como neuropéptido con acción en el sistema inmune, y por ello apodado como una 'neuroquina', VIP administrado *in vivo* tiene un potente efecto anti-inflamatorio en modelos animales de enfermedades autoinmunes así como en experimentos *in vitro* con células de pacientes (Abad C et al 2003; Delgado M et al 2001; Rosignoli F et al 2006; Herrera JL et al 2006; Gutierrez-Canas I et al 2006). En ratones NOD se lo ha administrado en la etapa prediabética y en la diabética con distintos esquemas de administración (transferencia génica local o dosis sistémicas en días alternos desde la semana 3-4 de vida del ratón), y en todos los casos se observó modulación de citoquinas pro-inflamatorias plasmáticas hacia el tipo Th2, reducción de la incidencia de diabetes (Herrera JL et. al 2006; Rosignoli F et. al 2006) o reversión de la falla secretoria salival (Lodde BM et. al 2006) Sin embargo, dada la multiplicidad de blancos inmunes y neuroendocrinos que puede tener el VIP en un tratamiento *in vivo*, no está aclarado aún si estos efectos son directos sobre células del sistema inmune o a través de la producción endógena de otros inmunosupresores como, por ejemplo, glucocorticoides. En particular en el trabajo con ratones NOD prediabéticos usados como modelo del Síndrome de Sjögren, la restauración de la función secretoria salival por transferencia local de VIP con un adenovirus parece más ligada al efecto secretorio del péptido que a una reducción significativa de la respuesta inflamatoria (Lodde BM et. al 2006).

Más allá de la potencialidad de los tratamientos con VIP en dosis farmacológicas o las estrategias de administración local, el VIP, tanto por su acción prosecretoria sobre la glándulas exocrinas (Ekström J et al 1983; Inoue Y et al 1985) como por la acción anti-inflamatoria y pro Th2 en diversos modelos de inflamación (Gomariz RP et al 2006; Delgado M et al 2004), resulta un candidato atractivo para ser estudiado no sólo como tratamiento sino también como factor patogénico en el Síndrome de Sjögren y en este modelo. Así, en trabajos previos propusimos que un defecto en la acción de VIP sobre las células blanco (vasos, acinos, células inmunes) o en la producción de VIP por células nerviosas e inmunes a nivel local, podrían explicar algunos aspectos de la etiopatogenia de la enfermedad (Rosignoli F, et al 2001; Rosignoli F & Perez Leiros C 2002; Rosignoli F et al 2004).

En cuanto a los resultados presentados sobre la acción del VIP sobre la producción de nitritos en macrófagos NOD y BALB/c aquí, y en el marco del VIP en patogenia, vale comentar que si bien el VIP exógeno resultó efectivo y sus receptores VPAC1 funcionales en macrófagos de ambas cepas, hemos encontrado ciertas diferencias: Por ejemplo, en los experimentos se empleó una concentración mayor que la IC50 para bloquear los efectos del VIP de modo de lograr el máximo efecto inhibitorio en ambas cepas, sin embargo en las curvas concentración-respuesta y con el cálculo de este parámetro se puso en evidencia que VIP es menos potente en macrófagos NOD que en controles. En coincidencia con estos resultados, resultados preliminares del laboratorio indican menores niveles de expresión de VIP en glándulas salivales de ratones NOD de 16 semanas. En glándulas salivales de pacientes se describió una menor inervación por fibras que contienen VIP alrededor de sitios de infiltración (Törnwall J et al 1994). Estas observaciones dan lugar a hipotetizar que los macrófagos reclutados en las glándulas durante el proceso inflamatorio podrían estar sujetos a menores concentraciones del neuropéptido. Resultados preliminares con macrófagos extraídos de las glándulas salivales de ratones NOD de 16 semanas están en línea con esta hipótesis ya que presentan un fenotipo más desregulado aún, por ejemplo, pueden responder a LPS *in vitro* sin requerir IFN- $\gamma$  (Calafat M et al 2007).

Existen evidencias que indican que la transcripción de IL-10 puede estar regulada por factores constitutivos tales como Sp1 y Sp3 que serían responsables de la producción de bajos niveles de IL-10 para mantener controladas la inflamación 'basal' (Tone M et al 2000) mientras que Stat3 estaría involucrada en la producción de IL-10 inducida por LPS (Moore KW et al 2001). Los resultados presentados con VIP en la producción de IL-10 sugieren un mecanismo a través de metabolitos de COX-2, que en macrófagos se demostró que se induce vía NF-kB.

El factor NF-kB tiene un rol fundamental en la mayoría de los desordenes inflamatorios crónicos con aumento de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores pro-inflamatorios que, en la mayoría, los promotores de sus genes contienen el sitio de unión kB (Yamamoto & Gaynor 2001; Christman et al., 2000, Neurath et al., 1998; Schreiber et al., 1998, Feldmann, 1996; Roman-Blas and Jimenez 2006). Existen muchos estudios que describen que la expresión de citoquinas pro-inflamatorias se debe a la activación de distintos factores tales como NF-kB, NF-IL6, C/EBP, y factores regulatorios de interferón (IFN) (Grove M et al 1993; Stein B & Baldwin AS 1993; Murphy TL et al 1995; Ma X et al 1997; Plevy SE et al 1997; Grazia Cappiello M et al 2001), pero poco se conoce acerca de la regulación de las citoquinas

anti-inflamatorias. De hecho en macrófagos peritoneales de ratón el LPS induce ambos grupos de citoquinas, lo que cambia es la cinética de liberación de esos mediadores (Bogdan C et al 1991).

En un tercer grupo de experimentos analizamos, entonces, la participación de uno de estos factores, el NF- $\kappa$ B, y otras rutas de señalización en la activación de los macrófagos NOD. Observamos que los macrófagos peritoneales de ratones NOD prediabéticos presentan una translocación basal de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, mientras que los ratones controles BALB/c requieren de un estímulo inflamatorio como el LPS para que la subunidad p65 se transloque al núcleo y se activen las vías proinflamatorias.

Las imágenes de microscopía confocal son consistentes con la expresión aumentada de p65 en núcleos que evidencian la translocación basal de p65 en macrófagos NOD. Estas imágenes fueron confirmadas por western blot. Evidencias de pre-activación de NF- $\kappa$ B en macrófagos sin necesidad de estímulo inflamatorio *ex vivo* se han informado, por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiple (Christophi GP et al 2009), en tumores primarios y en líneas celulares tumorales, y su activación constitutiva también está involucrada en algunas formas de cáncer (Rayet & Gelinas 1999; Wong ET & Tergaonkar V 2009). Estas últimas consideraciones ponen en relieve el hecho que trabajamos con macrófagos peritoneales residentes y sin embargo el sistema ya está activado.

En cuanto a la cinética de activación de NF $\kappa$ B con LPS en la cepa control, el patrón evaluado por translocación de p65 y desaparición de la isoforma  $\alpha$  de I $\kappa$ B a los 15 min y reaparición en el citoplasma desde los 30 minutos evaluados por western blot es similar a lo observado recientemente por otros autores en un cultivo primario de macrófagos murinos (Cuenca J et al 2007). En cambio, en NOD no es posible establecer claramente dichos tiempos. De hecho, en los NOD la desaparición de I $\kappa$ B del citosol es menos evidente y su reaparición no ocurre aún a los 60 minutos de incubación. Algunos autores sugieren que un patrón cinético diferencial (activación basal o cinética alterada) puede asociarse a fallas en las proteínas I $\kappa$ B o bien cambios en las rutas río arriba de esta proteína que conducen a la activación de NF- $\kappa$ B. Hayashi y colaboradores trabajando con ratones NOD diabéticos, proponen que una mayor localización de NF- $\kappa$ B en el citoplasma de linfocitos puede deberse a un defecto en la degradación en el proteasoma (Hayashi T & Faustman D 2000), sin embargo hay escasa información sobre este factor en los macrófagos NOD en el estadio pre-diabético.



Por otro lado, se ha informado que los glucocorticoides *in vivo* e *in vitro* inhiben la degradación de I $\kappa$ B (De Bosscher et al 2006). Los ratones empleados en nuestro trabajo presentan niveles relativamente elevados de corticosterona sérica pero son idénticos a los de los ratones controles, como se ha descrito en la caracterización del modelo (Materiales y métodos), lo cual sugiere que otros mecanismos de regulación estarían activos. Las concentraciones plasmáticas del corticoide endógeno tanto en NOD como en BALB/c están en consonancia con las condiciones de cría, la manipulación semanal de las hembras en el bioterio y el ayuno previo a la toma de muestras tanto para ratones NOD como controles (Durant S et al 1998; Harizi et al 2007). De todos modos, no podemos descartar que un desbalance neuroendócrino involucrando a otros factores en el modelo NOD pueda tener un rol en este efecto.

El efecto de VIP también fue analizado en la activación de NF $\kappa$ B, medida como la translocación de p65 y cinética de desaparición y reaparición de la banda de I $\kappa$ B por western blot. Observamos que VIP inhibe la translocación del factor en los macrófagos de ambas cepas, reafirmando su acción anti-inflamatoria descrita en la primera parte de los resultados.

Finalmente estudiamos diversas vías de transducción involucradas en el efecto de VIP en presencia del estímulo inflamatorio de LPS utilizando inhibidores para cada vía. Dos inhibidores de la translocación de NF- $\kappa$ B/p65 que actúan a diferentes niveles, uno inhibiendo a la quinasa responsable de la degradación del complejo que mantiene unido a p65 en el citoplasma, y otro que inhibe a nivel del proteasoma, redujeron la producción de nitritos en presencia de LPS como era esperable, sin interferir con el efecto de VIP en macrófagos NOD ni BALB/c. En los controles, los macrófagos con LPS parecen requerir de la vía de p65 para producir IL-10, consistente con la activación de otras vías con enzimas como la COX-2, simultáneas a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias y que favorecen una respuesta regulada. En NOD, VIP induce IL-10 aún en presencia de sulfasalazina, un resultado que refleja por un lado el efecto directo de VIP sobre PGE2 y sobre IL-10 que se ve especialmente en NOD, así como la mayor complejidad de la respuesta al LPS en los NOD.

Trabajos recientes indican que VIP suprime la expresión de TLR4 en células CD11b<sup>+</sup> en el modelo de enfermedad de Crohn inducido en ratones con TNBS (Arranz A et al 2008) y, dado que se ha informado que algunas posibles vías por las cuales se activan PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B, serían iniciadas por activación de los TLRs, estudiamos cómo es la relación de ambas rutas en la cepa NOD. Los resultados no reflejan una modulación específica por PI3K/Akt en los efectos del LPS o del VIP sino, más bien, una reducción de



todos los parámetros, pro o anti-inflamatorios medidos, disminuyendo la intensidad de todos los mediadores sin que se modifiquen sus perfiles de producción. No ha sido aclarado el efecto que posee la ruta PI3K/Akt en la activación de NF- $\kappa$ B, ya que algunos reportes indican que PI3K puede estar involucrada en la resolución de la inflamación a través de la disminución de NF- $\kappa$ B (Tsukamoto K et al 2008), mientras que otros autores indican que PI3K induce la translocación de NF- $\kappa$ B y regula positivamente la activación de células inmunes produciendo citoquinas, incluso se describen distintas isoformas de la enzima (Wymann, MP & Pirola L 1998; Oudit GY et al 2004). Se ha reportado que el bloqueo del subtipo PI3K $\gamma$  suprime la inflamación en modelos murinos de artritis reumatoidea y lupus (Barber DF et al 2005; Williams et al 2006; Strassheim D et al 2004). En nuestro modelo la inhibición de PI3K claramente disminuye la producción de los nitritos en todos los tratamientos, sin embargo el inhibidor utilizado bloquea varias isoformas diferentes de esta ruta, de tal modo que sería necesario confirmar estos resultados con un inhibidor específico del subtipo PI3K $\gamma$  para poder asignarle un rol a esta enzima en las vías estudiadas. Respecto del VIP, existen escasos trabajos que relacionen VIP con PI3K, especialmente en macrófagos.

En los macrófagos NOD observamos que VIP requiere la vía AMPc/PKA tanto para inhibir la producción de nitritos como para aumentar la producción de IL-10. Teniendo en cuenta que VIP induce PGE2, la cual también aumenta AMPc (Liu H et al 2007), y que especialmente en los NOD se requiere PGE2 para la producción de IL-10, es probable que H89 actúe sobre la vía PKA inducida por ambos estímulos.

### Parte 2:

La preñez es un proceso finamente regulado, donde mecanismos locales y sistémicos actúan en forma sincronizada para permitir al sistema inmune materno tolerar al feto durante la gestación. Los macrófagos además de integrar los circuitos endócrinos-inmunes tienen un rol importante durante la preñez ya que poseen un rol crucial para proveer al dialogo materno-fetal en el período peri y post implantatorio (Mor G et al 2006). Se sabe que la concentración de los macrófagos en la interfaz constituye entre un 20 y 30% de las células deciduales y permanece constante durante toda la gestación sugiriendo que cumplen funciones diversas para el mantenimiento de la homeostasis tisular. De hecho pueden remover células senescentes, detritos celulares y microorganismos, neutralizando y previniendo una

respuesta inflamatoria exacerbada que sería deletérea para la gestación (Kabawat SE et al 1985; Abrahams VM et al 2004).

Teniendo en cuenta el perfil alterado observado en los macrófagos NOD (sin estimular y frente al LPS) y el mayor índice de reabsorción embrionaria que presentan estas hembras a partir de la semana 16, investigamos el perfil de los macrófagos NOD durante la gestación y el efecto de VIP.

En los macrófagos de hembras NOD durante la preñez observamos que se normalizan los niveles basales de IL-12 y nitritos, y en cuanto a la producción de mediadores con LPS presentan un comportamiento similar a hembras controles. De igual manera, con respecto a la activación de NF-kB, los resultados sugieren que no hay activación basal del factor mientras que la respuesta al LPS sigue mostrando diferencias cinéticas en IκB entre BALB/c y NOD como se veía en hembras NOD vírgenes. VIP modula las citoquinas inducidas en NOD y BALB/c. La falta de respuesta al VIP en nitritos se ve en las dos cepas sugiriendo que la gestación modificaría también los mecanismos de regulación en los macrófagos.

La progesterona es la principal hormona de la preñez y se la considera un potente modulador durante el proceso de implantación embrionaria a través de favorecer un perfil de citoquinas del tipo Th2 para el crecimiento fetal (Szekeres-Bartho 2002). Puede actuar estimulando ciertas citoquinas y factores de crecimiento como el VEGF o HGF en macrófagos con un marcado efecto inmunosupresor (Khan KN et. al 2005). Recientemente se demostró en la línea de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados con LPS que la progesterona inhibe la producción de IL-6 y nitritos, la inducción de iNOS y reduce la expresión de TLR4 a través de inhibir la activación de NF-kB y e inducir SOCS1 (Su L et. al 2009). Estas características explican en parte el efecto beneficioso de la gestación sobre la respuesta inflamatoria crónica en diversas enfermedades autoinmunes a predominio Th1 como la artritis reumatoidea (Cutolo M et al 2008)

La progesterona ejercería su acción anti-inflamatoria sobre los macrófagos actuando a distintos niveles y combinada en muchos casos con la acción de los estrógenos (Silberman DM et al 2003; Bird et al 2008; Routley CE et al 2009) El hecho que la progesterona agregada *in vitro* en nuestros ensayos no haya sido suficiente para simular el estado de inmunosupresión con aumento de IL-10 observado en los macrófagos de hembras preñadas confirma que el mecanismo *in vivo* involucra otras células inmunes y factores.

### Parte 3:

Los macrófagos tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular por su función fagocítica para la remoción de productos de degradación y células apoptóticas liberando mediadores con efectos antagónicos o complementarios, como es el caso de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-10 y TGF- $\beta$ , donde TGF- $\beta$  aumenta la producción de IL-10 en macrófagos murinos (Kitani A et al. 2003; Elenkov IJ and Chrousos GP 2002; Ayala A and Chaudry IH 1996). Una de las consecuencias de una actividad fagocítica deficiente o una mala resolución de la inflamación aguda es el establecimiento de un proceso inflamatorio crónico con diversos eventos asociados como, por ejemplo, alteración de la homeostasis, falla funcional, posible pérdida de la tolerancia inmunológica y autoinmunidad. En efecto se ha descrito este mecanismo en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes como el lupus, fibrosis quística, aterosclerosis, entre otras (Gaip US et al 2005; Cox G et al 1995; Haslett C et al 1994; Saha P et al 2009).

En línea con este concepto, pueden citarse varios ejemplos de autoinmunidad tejido específica donde se hipotetiza que la pérdida de tolerancia inmunológica contra células del órgano blanco sucede a un desequilibrio homeostático o funcional asociado a la muerte de células del mismo. Uno de ellos es el Síndrome de Sjögren (Fox et al 2000) que se diagnostica en edades avanzadas pero que en su inicio tendría una secuencia de daño funcional y pérdida de epitelio secretorio seguida de respuesta autoinmune. Sin embargo, el hecho que el diagnóstico se hace cuando la enfermedad autoinmune ya está instalada impide analizar eventos tempranos a este nivel en muestras o tejidos de los pacientes, y para ello resultan de especial valor los modelos experimentales que permiten analizar el perfil de actividad de distintos tipos celulares desde la etapa embrionaria y durante el desarrollo de la enfermedad.

En este sentido, el modelo murino de los ratones NOD es un buen ejemplo de alteraciones bioquímicas tempranas en tejidos blanco que preceden a la respuesta autoinmune contra las glándulas exocrinas. En estos ratones se ha sugerido que la respuesta pro-inflamatoria y con perfil predominante Th1 puede iniciarse en un defecto en la señalización de las glándulas salivales (Kong L et al 1998; Robinson CP et al 1996; Rosignoli F et al 2004; 2005). Por otro lado, en ratones NOD diabéticos, se ha propuesto que el control anormal de la fagocitosis de neuronas apoptóticas (que se acumulan en el microentorno de los islotes del páncreas de estos ratones) podría contribuir como evento temprano a la autoinmunidad (Saravia F & Homo-Delarche F 2003).

Los macrófagos NOD de hembras vírgenes enfrentados a timocitos apoptóticos presentaron mayores niveles de nitritos y  $\text{TNF-}\alpha$ , mediadores pro-inflamatorios y menor producción de IL-10 tanto en condiciones basales como frente al estímulo fagocítico. El perfil de producción de mediadores proinflamatorios y la baja producción de IL-10 es similar a lo observado frente a LPS. VIP también aquí moduló la respuesta inflamatoria a través de la producción de IL-10 y metabolitos de COX, como por ejemplo la PGE2, limitando la producción de nitritos. Tal como sucedía cuando los macrófagos NOD eran incubados con LPS, en el co-cultivo macrófago - timocito, la presencia de VIP aumentó IL-10 y disminuyeron  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{TNF-}\alpha$ , además indometacina inhibió el efecto de VIP incrementando los niveles de IL-10 y reduciendo la producción de nitritos, efecto consistente con el de PGE2 exógena sobre los nitritos.

Mediante microscopia confocal en estos ensayos confirmamos la translocación de p65 basal en los macrófagos peritoneales de ratones NOD así como frente al estímulo fagocítico, mientras que los macrófagos BALB/c requieren del estímulo para la translocación del factor. El perfil cinético es diferente entre las cepas, y la principal diferencia en cuanto a la fagocitosis se ve en el índice a tiempos cortos. Encontramos que los macrófagos BALB/c al poco tiempo de ser expuestos al estímulo fagocítico aumentan su avidez por endocitar, resultado que se refleja en el rápido aumento en los índices de fagocitosis que en NOD no mantienen la misma cinética, equiparándose los valores a los 90 minutos.

VIP inhibe la translocación del factor en ambas cepas e inhibe parcialmente la función fagocítica medida como índice de fagocitosis. Esta inhibición parcial de VIP puede deberse en parte a que el efecto *in vitro* fue medido a 30 minutos coincidente con el tiempo de la máxima intensidad de fluorescencia de p65 en los núcleos de los macrófagos.

La respuesta deletérea de los macrófagos de hembras NOD enfrentadas con timocitos apoptóticos singeneicos, la reducción en la velocidad inicial con que endocitan células apoptóticas, sumados al defecto en las rutas regulatorias para la síntesis de mediadores en los macrófagos NOD que vimos en este trabajo podrían contribuir a conferir una mayor susceptibilidad para desarrollar la enfermedad.

Los procesos de fagocitosis de células apoptóticas, en contraste con otros tipos de fagocitosis mediadas por Fc-R, deben operarse en forma anti-inflamatoria e 'inmunológicamente silenciosa' (Savill et al, 2002). Todas las señales que confluyen para que el proceso sea rápido e inmunosuprimido evitan la liberación de constituyentes celulares dañinos por las células en apoptosis. Mientras que  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8, IL-18, GM-CSF, IL-12 e IL-1 se identifican como señales deletéreas; IL-10, PGE2, factor activador de plaquetas (PAF) y

TGF- $\beta$  están comprometidas como inmunosupresoras en una remoción eficiente (Fadok VA et al 1998; Sun EW & Shi YF 2001).

Otros autores han mostrado que los macrófagos de ratones NOD diabéticos expresan altos niveles de citoquinas frente a células necróticas y apoptóticas (Soffels K et al 2004), y que, desde edades muy tempranas (3 semanas) los NOD muestran un menor porcentaje de macrófagos capaces de endocitar cuerpos apoptóticos (% de fagocitosis), función que se normaliza con la edad en los NOD (O'Brien BA et al 2002). Trabajando con modelos teóricos de biología celular y el ajuste de los resultados de fagocitosis a esos modelos, se ha propuesto que la velocidad de endocitosis de cuerpos apoptóticos por macrófagos BALB/c se ajusta a un modelo 'de activación secuencial'. Dicha secuencia, reflejada en mayor medida en el índice que en el % de fagocitosis, implica que una vez endocitado el primer cuerpo apoptótico el fagocito normal se activa y aumenta su velocidad de endocitosis para los siguientes cuerpos apoptóticos (Marée AF et al 2008).

Vale destacar que en los experimentos de co-cultivo para determinar fagocitosis empleamos tiempos cortos (15 a 90 minutos). Esto permite evaluar el proceso de endocitosis y la avidéz, preponderante en esta etapa, por encima de la digestión. Se estima que a los 60 minutos en macrófagos normales estimulados *in vitro* con células apoptóticas, se equilibran estas velocidades (endocitosis y digestión) y que a partir de los 90 minutos y en las siguientes 5 horas predomina la digestión (Marée 2008). Estos autores comprueban en macrófagos NOD de 3 semanas de edad comparados con BALB/c una diferencia cinética comparable a la obtenida en nuestro trabajo en ratones mayores: los BALB/c tendrían mejor ajuste con el modelo de activación tras la primera partícula ingerida que los NOD. De todos modos para realizar esos ajustes a modelos teóricos es necesario un diseño experimental donde a partir de los 90 minutos se separan las células apoptóticas y se mantienen los cultivos por 2 a 5 horas para analizar cada proceso con mayor identidad, que no era la intención de nuestro trabajo. A diferencia de otros autores que inducen apoptosis en timocitos con luz UV, preferimos trabajar con timocitos apoptóticos inducidos con dexametasona por ser un modelo estandarizado de apoptosis temprana, muy reproducible y factible de ser caracterizado cuantitativamente por citometría. Se realizaron co-cultivos singéneos, es decir macrófagos NOD con timocitos NOD y los mismo en BALB. Además consideramos como valores basales de porcentaje e índice de fagocitosis los obtenidos en el co-cultivo de macrófagos con timocitos sin inducir con dexametasona como una mejor estimación de la condición basal. Esto podría explicar que en el co-

cultivo NOD en condiciones basales, es decir macrófagos NOD con timocitos NOD no inducidos, se obtuvieron valores mayores de fagocitosis que en los análogos en BALB, dado que en general observamos una población más abundante en células apoptóticas en la preparación NOD sin inducir.

Por último, el tratamiento *in vivo* de ratones con células apoptóticas inyectadas por vía intra-peritoneal, o con inhibidores como el VIP, podrían resultar en diferencias más marcadas en el porcentaje de fagocitosis entre NOD y BALB/c que las obtenidas en este trabajo, como se ve en los primeros 60 minutos post-inyección en un diseño *in vivo* con timocitos inducidos con UV (O' Brien et. al 2006).

### Parte 4:

La concentración de los macrófagos en la interfaz materno-fetal constituye entre un 20 y 30% de las células deciduales y permanece constante durante toda la gestación sugiriendo que cumplen funciones diversas para el mantenimiento de la homeostasis tisular manteniendo un apropiado balance Th1-Th2 (Mor G et.al 2006).

En el cocultivo de macrófagos de hembras preñadas con timocitos apoptóticos en nuestro trabajo los valores son más bajos que en hembras vírgenes y no se observan diferencias en el porcentaje de fagocitosis entre ambas cepas, en ninguna de las condiciones estudiadas. En cuanto al índice de apoptosis sugiere una menor avidez para fagocitar en la cepa NOD. Si bien hay una producción de nitritos disminuida en los NOD, pero no nula o basal como en la cepa BALB/c, esto podría deberse a que durante la preñez normal las células apoptóticas promueven la liberación, en bajas concentraciones, de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  para inducir la liberación de citoquinas anti-inflamatorias (Miller L et. al 1996). Este podría ser el caso en los macrófagos NOD estudiados aquí, ya que durante la preñez el estímulo apoptótico fue suficiente para aumentar la producción de IL-10, sin requerir del estímulo de VIP, como sucede cuando las hembras no están preñadas. En ratones transgénicos que no producen IL-10 (IL-10  $-/-$ ) se observó que se producía implantación con fetos viables, es decir que IL-10 no es necesaria para el mantenimiento de la preñez; sin embargo cuando a esos ratones se los exponía a LPS disminuía la viabilidad de los fetos sugiriendo que IL-10 sería necesaria para ejercer un efecto protector frente a patógenos durante la gestación, regulando la producción de citoquinas deletéreas en altas concentraciones (Robertson S. A et. al 2007). Con respecto a la activación de NF-kB, los resultados

sugieren que no hay activación basal del factor como se veía en hembras NOD vírgenes y que sigue una cinética similar en las dos cepas, consistente con el cambio en el perfil de los mediadores.

### Parte 5

Más arriba se mencionó que la respuesta autoinmune contra las glándulas exócrinas de la cepa NOD podría iniciarse en etapas tempranas por un defecto en la homeostasis o señalización de las glándulas salivales. Los acinos son unidades secretorias conformadas por células epiteliales que están sujetas a modulación por neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, entre otros. El equilibrio entre proliferación y apoptosis en ausencia de mediadores deletéreos e las glándulas mantiene una población activa de acinos, ductos y vasos que regulan la tasa de secreción basal y frente a estímulos.

Dados los resultados obtenidos en co-cultivos de timocitos apoptóticos y macrófagos en esta tesis y por otros autores es factible hipotetizar que, entre otros mecanismos, una deficiente fagocitosis de acinos por los macrófagos NOD podría participar en la patogenia de la sialoadenitis de los NOD. Recientemente demostramos que las células acinares aisladas de glándula submaxilares de la cepa NOD durante la etapa pre-diabética presentan señales de una mayor apoptosis comparadas con la cepa BALB/c, ambas en estado de reposo, sin estímulos apoptóticos. Del mismo modo hemos visto que frente a un estímulo apoptótico como TNF, los acinos NOD son más sensibles a la apoptosis (Calafat et al 2009).

Basados en estos resultados investigamos cómo reaccionaban los macrófagos peritoneales frente a los acinos apoptóticos obtenidos frescos de glándulas submaxilares. Vale destacar que llamamos “acinos apoptóticos” a los acinos extraídos de las glándulas submaxilares en condiciones de reposo de hembras NOD de 16 semanas. En los ensayos de fagocitosis observamos una baja ingestión de cuerpos apoptóticos comparados con los porcentajes e índices del co-cultivo con timocitos apoptóticos en los tiempos estudiados. Observamos que la cepa NOD tiene menor índice endocítico, que los controles aunque los valores son muy bajos en ambos. Además, los macrófagos de ratones NOD prediabéticos enfrentados a acinos apoptóticos producen mayores niveles de nitritos y menor cantidad de IL-10, similar a lo que sucedía frente a LPS y timocitos apoptóticos, consistente con una falla en el proceso de eliminación de células muertas en el tejido. Con respecto a IL-10 se sabe que su producción requiere, a veces, del contacto célula-célula dependiente de CD36 quien además es esencial para la inducción de p38 MAPK (Elaine Y et al 2006). Nuevamente, los macrófagos NOD necesitan de la presencia de VIP para aumentar



IL-10 a niveles similares a los de la cepa control frente a acinos apoptóticos. Sin embargo VIP no produce la disminución de nitritos como venía sucediendo en todos los casos. El efecto de VIP para aumentar IL-10, si bien es evidente frente a timocitos apoptóticos, no es de la misma magnitud en este caso lo que podría en parte explicar la falta de disminución de nitritos.

Del mismo modo que se normaliza la respuesta al LPS, en los ratones NOD preñados se modula también la respuesta frente a células apoptóticas, tanto timocitos como acinos. Los macrófagos NOD de hembras preñadas presentaron un comportamiento similar a cuando eran estimulados con timocitos, esto es una menor producción de nitritos y una producción de IL-10 sin requerir a VIP como estímulo. Estos resultados concuerdan con Mor y colaboradores (2003) que proponen que la fagocitosis de células trofoblásticas apoptóticas suprime a los macrófagos activados, inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y promueve la liberación de citoquinas anti-inflamatorias e inmunosupresivas. (Mor G & Vikki M 2003).

Tomando en conjunto los resultados de macrófagos con timocitos y acinos apoptóticos durante la preñez, se observa reversión parcial de los efectos deletéreos descritos en macrófagos NOD frente a células apoptóticas, si bien no se normaliza como en los macrófagos controles. Teniendo en cuenta que estos macrófagos provienen de la cavidad peritoneal de hembras preñadas, los resultados sugieren que la alta tasa de reabsorción embrionaria a las 18 semanas de los ratones NOD es más dependiente de la activación local de las células T regulatorias, como se ha descrito (Roca V et al 2009, Lin et al 2008), que de la actividad de los macrófagos peritoneales.

Los experimentos de diálogo macrófagos–acinos usados en este trabajo, con acinos provenientes de NOD y controles con distintos grados de apoptosis basal, mostraron proporciones muy bajas de actividad fagocítica por los macrófagos y sin embargo, en los NOD, una respuesta inflamatoria comparable a la que induce LPS. Esto sugiere que la preparación de células apoptóticas induce la respuesta inflamatoria en el macrófago NOD independientemente del estímulo fagocítico o de su capacidad de fagocitar cuerpos apoptóticos. Los resultados de esta parte abren nuevos interrogantes sobre la interacción de células secretorias y macrófagos *in vivo* en las glándulas salivales de ratones NOD durante el desarrollo de la enfermedad; como así también los cambios que podrían ocurrir en las glándulas de hembras preñadas. Al respecto no hemos encontrado diferencias en la incidencia de diabetes por gestaciones múltiples en nuestra colonia NOD, tampoco en la tasa de flujo salival de hembras NOD multíparas que se mantiene disminuida, y lo mismo puede decirse de los mediadores inflamatorios liberados por sus macrófagos. Es



decir, la gestación modula la respuesta inflamatoria durante su curso, pero al cabo de la misma se restablecen los parámetros alterados. Una situación similar se da en las enfermedades autoinmunes en mujeres embarazadas. En efecto, en distintas enfermedades autoinmunes como la tiroiditis y la artritis reumatoidea, entre otras, sean o no órgano-específicas, ocurre que la gestación normaliza y mejora casi todos los parámetros de la respuesta inmune e inflamatoria, pero en el período inmediatamente post-parto, por ejemplo en la artritis, más del 70% de las pacientes sufren una recaída con un incremento de la respuesta inmune deletérea (Pope RM et al 1983; Cutolo M & Straub RH 2009).

### Conclusiones finales:

En este trabajo hemos enfocado ratones NOD en su etapa de disfunción secretoria normoglucémica y la respuesta de los macrófagos en la hipótesis que dichas células presentarían un perfil diferente y que esas diferencias podrían modularse por la acción de VIP o de la gestación sobre los macrófagos. Evaluamos dos tipos de estímulos, inflamatorio y fagocítico, y en el segundo caso, usamos como modelo de células apoptóticas una población estandarizada y reproducible como son los timocitos apoptóticos y una población de interés en el modelo como son los acinos. Los co-cultivos de acinos y macrófagos permitieron evaluar el grado de respuesta de los macrófagos más relacionado con los mediadores liberados en forma aberrante en los NOD, que con la eficiencia en la fagocitosis ya que fue muy baja en los tiempos empleados. Este diseño *in vitro*, y la modulación de todas las señales por el sistema VIP/VPAC en macrófagos mostradas en este trabajo, podría resultar útil para estudiar la interacción funcional inmune-secretoria, tanto desde el macrófago como desde el acino, en condiciones fisiológicas y en el curso de una respuesta autoinmune. De hecho, ambas células conservan su capacidad de activación y respuesta en el cultivo primario. Lo mismo puede decirse respecto de la potencialidad del modelo NOD en aspectos reproductivos, ya que permite analizar efectos de la gestación sobre la respuesta de macrófagos en su diálogo con células que se encuentran en procesos tempranos de alteración o senescencia en los tejidos.

## Bibliografía

- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP.** 2003 Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**:961–71
- Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G.** 2004 Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **51**:275-82
- Anderson MS & Bluestone JA.** 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual Review of Immunology* **23**:447-485
- Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Leceta J, Martinez C, Gomariz RP.** 2008 Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* **15**:46–53
- Arranz A, Androulidaki A, Zacharioudaki V, Martinez C, Margioris AN, Gomariz RP, Tsatsanis C.** 2008 Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Mol Immunol.* **45**:2970-80
- Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM.** 2000 Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med.* **6**:1147-53
- Ayala A, Chaudry.** 1996 IH Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock.* **1**:S27-38
- Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C, Camps M, Ruckle T, Schwarz MK, Rodriguez S, Martinez AC, Balomenos D, Rommel C, Carrera AC.** 2005 PI3Kg inhibition blocks glomerulonephritis and extends life span in a mouse model of systemic lupus. *Nature Med* **11**:933-935
- Bianchi, M.E.** 2007 DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leuk. Biol.* **81**:1-5
- Bird MD, Karavitis J, Kovacs EJ.** 2008 SEX DIFFERENCES AND ESTROGEN MODULATION OF THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE AFTER INJURY, *Cell Immunol.* **252**: 57–67
- Blander JM, Medzhitov R.** 2004 Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**: 1014–1018
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C.** 1991 Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* **174**:1549–55
- Brent S. McKenzie, Robert A. Kastelein and Daniel J. Cua.** 2006 Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. **27**:17-23

- Burke SD, Dong H, Hazan AD, Croy BA.** 2007 Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. *Diabetes*. **12**:2919-26
- Calafat M, Larocca L, Roca V & Perez Leiros C.** 2007. NOD Mice Exocrinopathy: Towards a Neuroimmune Link. *Neuroimmunomodulation* **14**:175–181
- Calafat M, Larocca L, Roca V, Hauk V, Pregi N, Nesse A, Pérez Leirós C.** 2009 Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF-alpha-induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands. *Arthritis Res Ther*. **11**:R53
- Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM.** 1996 The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neu-trophils and reduces chemotaxis in vitro. *J Autoimmun* 2004 **17**: 675–9
- Chaouat G, Dubanchet S & Ledee N** 2007 Cytokines: Important for implantation? *Journal of Assisted Reproductive Genetics* **24**:491-505
- Chaouat G, Menu E, Kinsky R, Brezin C.** 1990 Immunologically mediated abortions: one or several pathways? *Res Immunol* **141**:188-95
- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N & Martal J.** 2002 A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunology* **53**:241-256
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., Rock, K. L.** 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells *Nat. Med.* **13**:851-856
- Cheon H, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Song GG, Sohn J, Won NH, Ji JD.** 2006 Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. *J Immunol* **177**:1092–100
- Chorny A, Gonzalez-Rey E & Delgado M.** 2006 Regulation of dendritic cell differentiation by vasoactive intestinal peptide: therapeutic applications on autoimmunity and transplantation. *Annals of the New York Academy of Science* **1088**:187-194
- Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS.** 2000 The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest*. **117**:1482-7
- Christophi GP, Panos M, Hudson CA, Christophi RL, Gruber RC, Mersich AT, Blystone SD, Jubelt B, Massa PT** 2009 Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient SHP-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. *Lab Invest*. **89**:742-59
- Cox G, Crossley J, Xing Z.** 1995 Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**:232–7

**Croy BA, Chantakru S, Esadeg S, Ashkar AA & Wei Q** 2002 Decidual natural killer cells:key regulators of placental development (a review) *Journal Reproductive Immunology* **57**:151-168

**Cuenca J, Goren N, Prieto P, Martín-Sanz P, Boscá L.** 2007 Selective impairment of nuclear factor-kappaB-dependent gene transcription in adult cardiomyocytes: relevance for the regulation of the inflammatory response in the heart. *Am J Pathol.* **171**:820-8

**Cutolo M, Straub RH.** 2009 Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis Res Ther.* **11**:218

**Dangoor D, Rubinraut S, Fridkin M, Gozes I.** 2006 Novel extended and branched N-terminal analogs of VIP. *Regul Pept.* **137**:42-9

**De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Haegeman, G.** 2006 Cross-talk between nuclear receptors and NF- $\kappa$ B. *Oncogene* **25**:6868-6886

**Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP & Leceta J.** 2002 Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of Molecular Medicine* **80**:16-24

**Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP.** 2001 Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* **7**:563–8

**Delgado M, Ganea D** 1999 Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation. *J Biol Chem.* **274**:31930-40

**Delgado M, Ganea D.** 2001 Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF $\kappa$ B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *J Immunol* **166**:1028–40

**Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP & Ganea D** 1999 Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of Immunology* **162**:1707–1716

**Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D.** 1999 Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *J Immunol* **162**:4685–96

**Delgado M, Pozo D, Ganea D.** 2004 The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* **56**:249–90

**Delgado M, Reduta A, Sharma V, Ganea D.** 2004 VIP/PACAP oppositely affect immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol* **75**:1122–30

**Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM & Manoussakis MN** 2002 CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjogren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clinical and Experimental Immunology* **127**:386–92

**Durant S, Christeff N, Coulaud J, Nunez EA, Dardenne M, Homo-Delarche F.** 1998 Basal concentrations of various steroids in the nonobese diabetic (NOD) mouse and effect of immobilization stress. *Autoimmunity*. **28**:249-58

**Ekström J, Mansson B, Tobin G.** 1983 Vasoactive intestinal peptide evokes secretion of fluid and protein from rat salivary glands and the development of supersensitivity. *Acta Physiol Scand* **119**:169–75

**Elaine Y Chung, Sun Jung Kim and Xiao Jing Ma** 2006 Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells *Cell Research* **16**:154–161

**Elenkov IJ, Chrousos GP.** 2002 Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. **966**:290-303

**Elenkov IJ.** 2004 Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci*. **1024**:138-46

**Erdosova B, Hlavkova L, Prochazkova J, Lichnovsky V.** 2002 Part of CD68<sup>+</sup> macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **146**: 41–45

**Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM.** 1998 Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**:890–8

**Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM.** 1992 Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**: 2207–2216

**Feldmann M.** 1996 What is the mechanism of action of anti-tumour necrosis factor-alpha antibody in rheumatoid arthritis? *Int Arch Allergy Immunol*. **111**:362-5

**Fox RI & Michelson P** 2000 Approaches to the treatment of Sjogren's syndrome *Journal of Rheumatology Supplement* **61**:15-21

**Fraccaroli L, Alfieri J, Larocca L, Calafat M, Mor G, Leirós CP, Ramhorst R.** 2009 A potential tolerogenic immune mechanism in a trophoblast cell line through the activation of chemokine-induced T cell death and regulatory T cell modulation. *Hum Reprod*. **24**:166-75

- Freudenberg MA, Ness T, Kumazawa Y, Galanos C.** 1993 The role of cytokines in endotoxic shock and in endotoxin hypersensitivity]Immun Infekt. **21**:40-4
- Gaipi US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M.** 2005 Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. **4**:189-94
- Gasparini C, Sacre S, Lundberg A, Paleolog E, Horwood NJ, Brennan FM, Foxwell BM.** 2002 Is NF-kappaB a useful therapeutic target in rheumatoid arthritis? Ann Rheum Dis. **2**:ii13-8
- Gil Mor and Vikki M Abrahams.** 2003 Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy Reprod Biol Endocrinol. **1**:119
- Goldman M, Marchant A, Schandene L.** 1996 Endogenous interleukin- 10 in inflammatory disorders: regulatory roles and pharmacological modulation. Ann NYAcad Sci **796**:282–92
- Gomariz R, Leceta J, Martinez C, Abad C, Ganea D & Delgado M.** 2000 Antiinflammatory actions of VIP/PACAP. Role in endotoxemia. Annals of the New York Academy of Science **921**:284-288
- Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martinez C, Rosignoli F, Garcia-Gómez M, Leceta J, Juarranz Y.** 2005 Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. J Leukoc Biol **78**:491–502
- Gomariz RP, Delgado M, Naranjo JR, Mellström B, Tormo A, Mata F, Leceta J** 1993 VIP gene expression in rat thymus and spleen. Brain Behav Immun **7**:271-8
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C.** 2006 VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. Ann N Y Acad Sci **1070**:51–74
- Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M.** 2001 Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. Curr Pharm Des. **7**:89-111
- Gonzalez Rey E & Delgado M.** 2007 Vasoactive intestinal peptide and regulatory T-cell induction: a new mechanism and therapeutic potencial for immune homeostasis. Trends in Molecular Medicine. **13**:242-251
- Gozes I, McCune SK, Jacobson L, Warren D, Moody TW, Fridkin M, Brenneman DE.** 1991 An antagonist to vasoactive intestinal peptide affects cellular functions in the central nervous system. J Pharmacol Exp Ther. **3**:959-66.
- Gregory CD, Devitt A, Moffatt O.** 1998 Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. Biochem Soc Trans. **26**:644-9

**Gressens P, Paindaveine B, Hill JM, Evrard P & Brenneman DE** 1998 Vasoactive intestinal peptide shortens both G1 and S phases of neural cell cycle in whole postimplantation cultured mouse embryos. *European Journal of Neuroscience* **10**:1734–1742

**Grobmyer SR, Barie PS, Nathan CF, Fuortes M, Lin E, Lowry SF, Wright CD, Weyant MJ, Hydo L, Reeves F, Shiloh MU, Ding A.** 2000 Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia. *Crit Care Med.* **5**:1276-82

**Grove M, Plumb M.** 1993 C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol* **13**:5276–89

**Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martínez C, Galindo M, Payá M, Gomariz RP, Pablos JL.** 2006 VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* **45**:527–32

**Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL, Leceta J.** 2008 Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun.* **22**:312-7

**Harizi H, Homo-Delarche F, Amrani A, Coulaud J, Mormède P.** 2007 Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenstivity. *J Neuroimmunol.* **189**:59-68

**Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA** 1998 International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* **50**:265–70

**Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC.** 1994 Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**:327–33

**Hayashi T, Faustman D.** 2000 Defective function of the proteasome in autoimmunity: involvement of impaired NF-kappaB activation. *Diabetes Technol Ther.* Autumn **2**:415-28

**Henson PM, Bratton DL, Fadok VA.** 2001 Apoptotic cell removal. *Curr Biol.* **19**:R795-805

**Henson PM, Hume DA.** 2006 Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol* **27**: 244–250

**Herrera JL, Fernández-Montesinos R, González-Rey E, Delgado M, Pozo D.** 2006 Protective role for plasmid DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice. *Ann N Y Acad Sci.* **1070**:337-41



**Hill JM, McCune SK, Alvero RJ, Glazner GW, Henins KA, Stanziale SF, Keimowitz JR, Brennen DE.** 1996 Maternal vasoactive intestinal peptide and the regulation of embryonic growth in the rodent. *Journal of Clinical Investigation* **97**:202-208

**Homo-Delarche.** 2004 Neuroendocrine immune-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune diabetes in the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse. *ILAR journal* **45**:237-251

**Hu Y, Purushotham KR, Wang P, Dawson R Jr, Humphreys-Beher MG.** 1994 Downregulation of beta-adrenergic receptors and signal transduction response in salivary glands of NOD mice. *Am J Physiol.* **266**:G433-43.

**Huie Jing, Evros Vassiliou and Doina Ganea.** 2003 Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells *journal of Leukocyte Biology* **74**:868-879

**Ialenti A, Iannaro A, Moncada S & Di Rosa M.** 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European Journal Pharmacology* **211**: 177-182

**Inagaki N, Yoshida H, Mizuta M, Mizuno N, Fujii Y, Gono T, Miyazaki J, Seino S.** 1994 Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **7**:2679-83.

**Inoue Y, Kaku K, Kaneko T, Yanahara N, Kanno T.** 1985 Vasoactive intestinal peptide binding to specific receptors on rat parotid acinar cells induces amylase secretion accompanied by cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. *Endocrinology* **116**:686-92

**Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S.** 1992 Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* **8**:811-19

**Jones LA, Anthony JP, Henriquez FL, Lyons RE, Nickdel MB, Carter KC, Alexander J, Roberts CW.** 2008 Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology.* **125**:59-69

**Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Canas I, Palao G, Galindo M, Abad Kabawat SE, Mostoufi-Zadeh M, Driscoll SG, Bhan AK** 1985 Implantation site in normal pregnancy. A study with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* **118**: 76-84

**Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Matsuyama T, Ishimaru T.** 2004 Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod.* **20**:1-13

**Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W.** *J Exp Med.* 2003 Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. **8**:1179-88.



- Kleinert H, Schwarz PM, Förstermann U.** 2003 Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* **10-11**:1343-64
- Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H.** 2005 VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* **30**:62–70
- Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, Talal N, Humphreys-Beher MG** 1998 Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NODscid mice. *Clin Exp Rheumatol* **16**:675–81
- Laburthe M, Rousset M, Boissard C, Chevalier G, Zweibaum A, Rosselin G.** 1978 Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**:2772–5
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M.** 2000 Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci.* **921**:92-102
- Lee M, O'Brien P.** 2008 Pregnancy and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **79**:1308-11
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN.** 2001 Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* **7**:612-9
- Lily Lai, Noosheen Alaverdi, Lois Maltais and Herbert C** 1998 Morse, III Mouse Cell Surface Antigens: Nomenclature and Immunophenotyping. *The Journal of Immunology* **160**:3861-3868
- Lin Y, Chen Y, Zeng Y, Wang T, Zeng S.** 2008 Lymphocyte phenotyping and NK cell activity analysis in pregnant NOD/SCID mice. *J Reprod Immunol.* **68**:39-51
- Lipton JM, Catania A** 1997 Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* **18**:140–5
- Liu H, Farley JM Sr.** 2007 Prostaglandin E2 enhances acetylcholine-induced, Ca<sup>2+</sup>-dependent ionic currents in swine tracheal mucous gland cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **322**:501-13
- Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP, Baum BJ.** 2006 Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* **65**:195-200
- Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M.** 2003 New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann NY Acad Sci* **994**:133–40

- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ.** 1993 The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* **334**:3–8
- Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT.** 2003 Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* **11**:2334-46
- Ma X, Neurath M, Gri G, Trinchieri G.** 1997 Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter. *J Biol Chem* **272**:10389–95
- MacKenzie CJ, Lutz EM, McCulloch DA, Mitchell R, Harmar AJ.** 1996 Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS 7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Ann NY Acad Sci* **26**:579–84
- Madar Z, Kalet-Litman S, Stark.** 2005 AH Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in Liver and Hepatocytes of Diabetic Rats. *Pharmacology.* **73**:106-112
- Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Jikken Dobutsu.** 1980 Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **29**:1-13
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., Abraham, S.N.** 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- $\alpha$ . *Nature.* **381**:77-80
- Manoussakis MN & Moutsopoulos HM.** 2000 Sjogren's syndrome, autoimmune epithelitis. *Bailliere's Clin Rheumatol* **14**:72–95
- Manthorpe R, Jacobsson LT.** 1995 Sjögren's syndrome. *Baillieres Clin Rheumatol* **9**:483-96
- Marée AF, Komba M, Finegood DT, Edelstein-Keshet L.** 2008 A quantitative comparison of rates of phagocytosis and digestion of apoptotic cells by macrophages from normal (BALB/c) and diabetes-prone (NOD) mice. *J Appl Physiol.* **104**:157-69
- Marguet D, Luciani MF, Moynault A, Williamson P, Chimini G.** 1999 Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat Cell Biol* **1**:454-6
- Maria Grazia Cappiello, Fayyaz S. Sutterwala, Giorgio Trinchieri, David M. Mosser and Xiaojing Ma.** 2001 Suppression of IL-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. *J Immunol* **166**:4498–506
- Marshak-Rothstein, A.** 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:823-835

- Masahide Tone, Mark J. Powell, Yukiko Tone, Sara A. J. Thompson and Herman Waldmann.** 2000 IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* **165**:286–91
- McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM.** 1999 Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*. **163**:6164-72
- McKnight, A. J., A. J. MacFarlane, P. Dri, L. Turley, A. C. Willis, S. Gordon.** 1996. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* **271**:486
- Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C.** 1992 Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* **52**:269-7
- Medzhitov, R.** 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. **449**:819-826
- Mellman, I., Steinman, R.M.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. **106**:255-258
- Miller L, Hunt JS.** 1996 Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci*. **59**:1-14
- Miyagawa J, Hanafusa T, Miyazaki A, Yamada K, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, Kono N, Nonaka K, Tochino Y, Tarui S.** 1986 Ultrastructural and immunocytochemical aspects of lymphocytic submandibulitis in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **51**:215-25
- Mohammad MK, Morran M, Slotterbeck B, Leaman DW, Sun Y, Grafenstein H, Hong SC, McInerney MF.** 2006 Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol* **18**:1101-13
- Montagut C, Rovira A, Albanell J** 2006 The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol*. **8**:313-7
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** 2001 Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**:683–765
- Mor G, Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM:** 2006 Macrophage trophoblast interactions. *Methods Mol Med* **122**: 149–163
- Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y** 2003 Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor-kappaB and oxidative stress. *Dev Growth Differ* **45**: 351–359

- Nathan C.** 1997 Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *Journal of Clinical Investigation* **100**:2417–2423
- Nathan C.** 2002 Points of control in inflammation. *Nature* **420**:846–52
- Nathan C., Shiloh, M.U.** 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:8841-8848
- Nathan, C** 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:173-182
- Neurath MF, Pettersson S.** 1997 Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology.* **198**:91-8
- O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT, Dutz JP** 2006 A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J Autoimmun.* **26**:104-15
- O'Brien BA, Huang Y, Geng X, Dutz JP, Finegood DT.** 2002 Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. *Diabetes.* **51**:2481-8.
- Ogando D, Cella M, Ribeiro ML, Weissmann C, Aisemberg J, Franchi A.** 2004 IL-10 inhibits nitric oxide synthesis in murine uterus. *Neuroimmunomodulation* **11**:127-32
- Ohmori Y, Onoue S, Endo K, Matsumoto A, Uchida S, Yamada S.** 2006 Development of dry powder inhalation system of novel vasoactive intestinal peptide (VIP) analogue for pulmonary administration. *Life Sci* **79**:138-43
- Onoue S, Yamada S, Yajima T** 2007 Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD. *Peptides* **28**:1640-50
- Oudit GY, Sun H, Benoit-Gilles K, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH** 2004 The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* **37**:449-471
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E.** 2006 High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**:C917-24
- Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB.** 2007 Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun.* **4**:303-9
- Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M.** 1994 Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* **71**:169–75

- Perez Martinez S, Farina M, Ogando D, Ribeiro ML, Gimeno M, Franchi AM.** 2000 Nitric oxide inhibits prostanoid synthesis in the rat oviduct. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **4**:239-42
- Piccirillo CA, Tritt M, Sgouroudis E, Albanese A, Pyzik M & Hay V** 2005 Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. *Annals New York Academy of Science* **1051**:72-87
- Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S** 1996 Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:12456–12460
- Pop SM, Wong CP, Culton DA, Clarke SH & Tisch R** 2005 Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *Journal of Experimental Medicine* **201**:1333-1346
- Pope RM, Yoshinoya S, Rutstein J, Persellin RH.** 1983 Effect of pregnancy on immune complexes and rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. **74**:973-9
- Rawlings SR, Hezareh M.** 1996 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* **17**:4–29
- Rayet B, Gélinas C.** 1999 Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. **18**:6938-47
- Robertson SA, Care AS, Skinner RJ.** 2007 Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biol Reprod*. **76**:738-48
- Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, Cooper C, Pichardo EL, Shah N, Peck AB, Humphreys-Beher MG.** 1997 Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjögren syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:5767-71
- Robinson CP, Yamamoto H, Peck AB, Humphreys-Beher MG** 1996 Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD-scid mouse: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* **79**:50–9
- Roca V, Calafat M, Larocca L, Ramhorst R, Farina M, Franchi AM, Leirós CP.** 2009 Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice. *Reproduction*. **138**:733-42
- Roca V, Larocca L, Calafat M, Aisemberg J, Meiss R, Franchi AM, Leirós CP.** 2006 Reduced nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase activity in the uterus of non-obese diabetic mice. *Reproduction*. **132**:931-8

- Roman-Blas JA, Jimenez SA.** 2006 NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. **14**:839-48
- Roman-Blas JA, Jimenez SA.** 2006 NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. **14**:839-48
- Rosignoli F, Goren N, Perez Leiros C.** 2001 Alterations in the activity and expression of nitric oxide synthase in submandibular glands of NOD mice. *Clin Immunol* **101**:86–93
- Rosignoli F, Pérez Leirós C.** 2002 Nitric oxide synthase I and VIP-activated signaling are affected in salivary glands of NOD mice. *J Neuroimmunol*. **130**:109-16
- Rosignoli F, Roca V, Meiss R, Leceta J, Gomariz RP & Perez Leiros C** 2005 Defective signalling in salivary glands precedes the autoimmune response in the non-obese diabetic mouse model of sialadenitis. *Clinical and Experimental Immunology* **142**:411–418
- Rosignoli F, Roca V, Meiss R, Pregi N, Pérez Leirós C.** 2004 Inhibition of calcium-calmodulin kinase restores nitric oxide production and signaling in submandibular glands of a mouse model of salivary dysfunction. *Br J Pharmacol* **143**:1058–65
- Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, Garcia-Gomez M, Martinez C, Gomariz R, Perez Leiros C & Leceta J.** 2006 VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Annals New York Academy of Science*. **1070**:525-530
- Routley CE, Ashcroft GS Wound Repair Regen.** 2009. Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. *Wound Repair Regen*. **17**:42-50
- Saha P, Modarai B, Humphries J, Mattock K, Watham M, Burnand KG, Smith A.** 2009 The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*. **9**:1-10
- Said SI, Mutt V.** 1969 A peptide fraction from lung tissue with prolonged vasodilatory activity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **107**:51–6
- Salem ML. Estrogen.** 2004 A double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. **3**:97-104
- Salomon R, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Voisin T, Lavallée D, Blais A, Darmoul D, Laburthe M.** 1993 Characterization of a common VIP-PACAP receptor in human small intestinal epithelium. *Am J Physiol* **264**:294–300
- Saravia F, Homo-Delarche F.** 2003. Is innervation an early target in autoimmune diabetes. *Trends Immunol*. **24**:574-579

- Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa MD.** 1995. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *British Journal Pharmacology* **114**:323-328
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C.** 2002 A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* **12**:965-75
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C.** 2002, *Nat Rev Immunol* **2**:965-975
- Savill J.** 1997 Role of molecular cell biology in understanding disease. *BMJ.* **314**:203-6
- Schlegel RA, Williamson P.** 2001 Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* **8**:551-63
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J.** 1998 Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**:477-84
- SE Plevy, JH Gemberling, S Hsu, AJ Dorner and ST Smale** 1997 Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* **17**:4572–88
- Serhan, C.N.** 2007. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:101-137
- Serhan, C.N., Savill, J.** 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**:1191-1197
- Shivers BD, Göröcs TJ, Gottschall PE, Arimura A.** 1991 Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology.* **6**:3055-65.
- Silberman DM, Wald MR, Genaro AM.** 2003 Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol.* **144**:53-60.
- Smith WL & Marnett LJ.** 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta* **1083**:1-17
- Spong CY, Lee SJ, McCune SK, Gibney G, Abebe DT, Alvero R, Brenneman DE & Hill JM.** 1999 Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **140**:917-924
- Stein B, Baldwin AS Jr** 1993 Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **13**:7191–8



- Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T.** 2003 Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch* . **139**:1479-88
- Stoffels K, Overbergh L, Giulietti A, Kasran A, Bouillon R, Gysemans C, Mathieu C.** 2004 NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J Autoimmun*. **23**:9-15
- Strand V, Talal N** 1979-1980 Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull Rheum Dis* **30**:1046-52
- Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Kuhn K, Mitra S, Abraham E:** 2004 Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *Immunology* **172**:5727-5733
- Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM.** 2007 Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* **82**:244-52
- Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J.** 2009 Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett*. **125**:151-5
- Sun EW Shi YF.** 2001 Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* **92**:135-45
- Szekeres-Bartho J, Faust ZS, Varga P, Szere day L & Kelemen K.** 1996. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *American Journal of Reproductive Immunology* **35**:348-351
- T L Murphy, M G Cleveland, P Kulesza, J Magram, and K M Murphy.** 1995 Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* **15**: 5258-5267
- Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J.** 1994 Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:12168-72
- Törnwall J, Uusitalo H, Hukkanen M, Sorsa T, Konttinen YT.** 1994 Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and its binding sites in labial salivary glands in Sjögren's syndrome and in normal controls. *Clin Exp Rheumatol*. **12**:287-92
- Tracey KJ.** 2007 Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007 Feb; **2**:289-96
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A, Margioris AN.** 2005 Urocortin 1 and urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett* **579**:4259-64



**Tsukamoto K, Hazeki K, Hoshi M, Nigorikawa K, Inoue N, Sasaki T, Hazeki O** 2008 Critical roles of the p110 beta subtype of phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-induced Akt activation and negative regulation of nitrite production in RAW 264.7 cells *J Immunol.* **180**:2054-61

**Vinay Kumar, Stanley Leonard Robbins.** 2007 basic pathology 8th edition, pp

**Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I.** 1997 Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* **390**:350-1

**Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF.** 1991 Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor- $\alpha$  which induces endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**:4220–4224

**Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A., Tracey, K. J** 1999 HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**:248-251

**Williams, David L.; Ozment-Skelton, Tammy; Li, Chaun.** 2006 Modulation of the Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway Alters Host Response To Sepsis, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *SHOCK* **25**:432-439

**Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L** 2005 Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol RevAug* **206**:306-35

**Wong ET, Tergaonkar V.** 2009 Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* **116**:451-65

**Wu KK.** 1995. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol.* **33**:179-207

**Wu X, Shih F, Atkinson J.** 2007 Systemic humoral autoimmunity but joint-specific inflammation: The syndrome of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **56**:2823-2828

**Wymann, M. P., L. Pirola.** 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 127-150

**Xin Z, Sriram S.** 1998 Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-12 and nitric oxide production in murine macrophages. *J Neuroimmunol* **89**:206–12

**Yamamoto H, Ishibashi K, Nakagawa Y, Maeda N, Zeng T, Robinson CP, Oxford GE, Chegini N, Humphreys-Beher MG.** 1997 Detection of alterations in the levels of neuropeptides and salivary gland responses in the non-obese diabetic mouse model for autoimmune sialoadenitis. *Scand J Immunol.* **45**:55-61

**Yamamoto Y, Gaynor RB.** 2001 Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med.* **1**:287-96

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Yamano S, Atkinson JC, Baum BJ, Fox PC.** 1999 Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/c mice. **92**:265-75

**Zhang X, Mosser DM** 2008 Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* **214**:161-78

**Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, Wang F, Guo A, Walczysko P, Gu Y, Sasaki T, Suzuki A, Forrester JV, Bourne HR, Devreotes PN, McCaig CD, Penninger JM** 2006 Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* **442**: 457–460

**Zupan V, Nehlig A, Evrard P, Gressens P.** 2000 Prenatal blockade of vasoactive intestinal peptide alters cell death and synaptic equipment in the murine neocortex. *Pediatr Res.* **47**:53-63

## ABREVIATURAS

15d-PGJ2	15 –desoxi-prostaglandina J2
AA	ácido araquidónico
Ab	anticuerpo
AMPc	3'- 5' adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína Activadora-1
ARN	ácido ribonucleico
ATB	antibiótico
BSA	Albumina de suero bovino
CaMK II	proteína kinasa dependiente de calcio y calmodulina II
CBP	proteína de unión a CREB
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
COX	ciclooxigenasas
COX-1	ciclooxigenasa 1
COX-2	ciclooxigenasa 1
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
Dexa	Dexametasona
ADN	ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GHRP	péptido liberador de la hormona de crecimiento
Gluc	glucosa
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GVHD	enfermedad injerto contra huésped
HMGB1	high-mobility group box 1
IDDM	diabetes mellitus dependiente de insulina
IFN- $\gamma$	interferón-gamma
IgG1	inmunoglobulina G1
IL-1	interleuquina 1
IL-10	interleuquina 10
IL-12	interleuquina 12
IL-17	interleuquina 17
IL-18	interleuquina 18
IL-6	interleuquina 6
IL-8	interleuquina 8
INDO	indometacina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
LES	lupus eritematoso sistémico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil-ester

## ABREVIATURAS

LNMA	NG-monometil-L-arginina
LPS	lipopolisacárido
LT	leucotrienos
LTA4	5 6-epóxido Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTB4	leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEKK1	quinasa 1 MAP/ERK
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
NAD	nicotinamida
NADH	nicotinamida
NADPH	Nicotin-adenín dinucleótido fosfato reducido
NF-kB	fator nuclear kappa B
NK	natural killer
NO	óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -	nitritos
NO <sub>3</sub> -	nitratos
NOD	ratones Diabéticos No obesos
NOS	óxido nítrico sintasa
ONOO-	peroxinitrito
P	progesterona
PACAP	péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
PAF	factor de activación plaquetaria
PAMP	patrones moleculares asociados con patógenos
PBS	buffer fosfato salino
PG	prostaglandinas
PGE2	prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	prostaglandina F2 $\alpha$
PGH2	prostaglandina H2
PGHS	prostaglandina endoperóxido H sintasa
PGI2	prostaciclina
PI	ioduro de propidio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	proteína quinasa
PLA2	fosfolipasa A 2
PRRs	receptores que reconocen patrones moleculares

## ABREVIATURAS

PtdSer	fosfatidilserina
RIA	radioinmunoensayo
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SFB	suero fetal bobino
SLE	lupus eritematoso sistémico
AR	artritis reumatoidea
SLPI	inhibidor de proteasas secretorias de leucocitos
SS	Síndrome de Sjögren
TBP	proteína de unión a caja TATA
TCR	receptor de células T
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante $\beta$
Timo AP	timocitos apoptóticos
Timo NA	timocitos no apoptóticos
TLR2	receptores tipo Toll 2
TLR4	receptores tipo Toll 4
TLRs	receptores de tipo toll
TNBS	ácido trinitrobencenosulfónico
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
TTBS	TBS-Tween
TUNEL	deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
TXA2	tromboxano A2
VIP	péptido intestinal vasoactivo
VIP1 VPAC1	Receptor de VIP/PACAP de tipo 1
VIP2 VPAC2	Receptor de VIP/PACAP de tipo 2
$\alpha$ -MSH	hormona estimulante de los melanocitos $\alpha$